

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/011527 A1

(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2018 (18.01.2018)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :

C07D 498/04 (2006.01) C12N 9/99 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2017/051925

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(22) Date de dépôt international :

13 juillet 2017 (13.07.2017)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1656791 13 juillet 2016 (13.07.2016) FR

(71) Déposants : BIOMÉRIEUX [FR/FR] ; 69280 Marcy
l'Etoile (FR). UNIVERSITÉ DE CAEN NORMANDIE
[FR/FR] ; Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen CE-
DEX 5 (FR).

(72) Inventeurs : URSUEGUI, Sylvain ; 8 rue Humann, 67000
Strasbourg (FR). LAURENT, Alain ; 3 rue Châteaubriand,
38100 Grenoble (FR). LAAYOUN, Ali ; 214 Chemin du
Trievoz, 38260 La Frette (FR). FABIS, Frédéric ; 10 Che-
min du Clos de Salle, 14920 Mathieu (FR).

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD ; 235 cours La-
fayette, 69006 Lyon (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),
européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,
FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: REAGENTS FOR REVERSIBLY PROTECTING BIOLOGICAL MOLECULES

(54) Titre : RÉACTIFS POUR LA PROTECTION RÉVERSIBLE DE MOLÉCULES BIOLOGIQUES

(57) Abstract: The present invention relates to reagents for reversibly protecting biological molecules. In particular, it relates to compounds derived from azaisotoic anhydride and the uses of same for protecting biological molecules, particularly enzymes, to block the activity thereof. The invention also relates to biological molecules that are protected in this manner, and to the methods for producing these reagents.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des réactifs pour la protection réversible des molécules biologiques. Elle porte en particulier sur des composés dérivés d'anhydride aza-isotoïque et leurs utilisations pour la protection de molécules biologiques, notamment les enzymes en vue de bloquer leur activité. L'invention vise également les molécules biologiques ainsi protégées et les procédés de mise en œuvre de ces réactifs.



WO 2018/011527 A1

REACTIFS POUR LA PROTECTION REVERSIBLE DE MOLECULES BIOLOGIQUES

La présente invention concerne des réactifs pour la protection réversible des molécules biologiques. Elle porte en particulier sur des composés dérivés d'anhydride aza-isatoïque et leurs utilisations pour la protection de molécules biologiques, notamment les enzymes en vue de bloquer leur activité. L'invention vise également les molécules biologiques ainsi protégées et les procédés de mise en œuvre de ces réactifs.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les tests modernes de diagnostic in-vitro, utilisant des techniques de biologie moléculaire en vue de la détection spécifique, rapide et quantitative d'acides nucléiques cibles présents dans un échantillon biologique utilisent le plus souvent des enzymes polymérases permettant l'amplification d'acides nucléiques cibles à partir d'amorces spécifiques.

Des polymérases dites « hot-start » ont été développées car elles présentent de nombreux avantages par rapport à leur version native et donnent en particulier de meilleures performances de sensibilité aux tests de diagnostic.

Le principe de fonctionnement d'une polymérase « hot-start » est de bloquer son activité de façon transitoire soit par un anticorps, un aptamère ou par un agent chimique puis de restaurer l'activité dès l'élévation de température pendant l'amplification PCR.

Le blocage par un agent chimique est tout particulièrement avantageux en raison de son coût peu élevé. L'inactivation des polymérases par une acylation des fonctions amine des résidus lysine a été décrite dans l'état de la technique (voir par exemple : Enzyme and Microbial Technology 36 (2005) 947–952 « Thermally reversible inactivation of Taq polymerase in an organic solvent for application in hot start PCR » Ariel Louwrier, Anne van der Valk). Lors de l'étape de dénaturation à 95°C pendant le premier cycle de PCR ou pendant une étape de préactivation à température élevée, les groupes protecteurs sont clivés et l'activité de l'enzyme est restaurée.

Les brevets US5677152 et US5773258 décrivent l'utilisation d'anhydride citraconique et ses dérivés en milieu aqueux pour protéger temporairement les groupements NH₂ des

lysines de la *Taq* polymérase. L'amide générée après réaction de l'anhydride et d'une amine est ensuite hydrolysable par le milieu rendu acide après traitement thermique en présence de tampon Tris utilisés dans les réactions PCR.

Il a été par ailleurs démontré que les dérivés d'anhydride isatoïque sont capables de réagir avec des groupements nucléophiles tels que les amines présentes sur les protéines. En 5 1982, Moorman A.R. et al. ont décrit l'acylation d'une protéine, la chymotripsine α , par l'anhydride isatoïque (Moorman A.R., Abeles R.H. J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 6785-6786). Cette réaction entraîne l'inactivation de la protéine en générant des dérivés anthraniliques stables. Plus récemment, Hooker et al. ont utilisé la réactivité de l'anhydride 10 isatoïque pour modifier les résidus lysines de molécules de lysozyme et ainsi introduire des motifs anilines qui peuvent ensuite être fonctionnalisés via un couplage oxydant (Hooker J. M., Esser-Kahn A. B., Francis M. B. J. Am. Chem. Soc., 2006, 106, 1558-1559). L'acylation du groupement amine présent sur la chaîne latérale des lysines par l'anhydride isatoïque conduit ainsi à la formation de liaisons amides très stables.

15 La demande de brevet FR1257526 décrit par ailleurs des agents acylants, dérivés d'anhydride isatoïques pour la fonctionnalisation, le marquage, la capture ou la séparation d'acide ribonucléiques (ARN) ou d'acide nucléiques chimériques (ARN/ADN). Les agents acylants sont plus spécifiquement décrits en vue de la fixation de groupement d'intérêt sur ces molécules biologiques.

20 La présente invention se propose de fournir de nouveaux réactifs pour la protection réversible de molécules biologiques, et notamment pour la préparation d'enzymes dites « Hot Start », c'est-à-dire qui peuvent être aisément déprotégées par un traitement thermique, lesdits nouveaux réactifs présentant de préférence un ou plusieurs des avantages suivants :

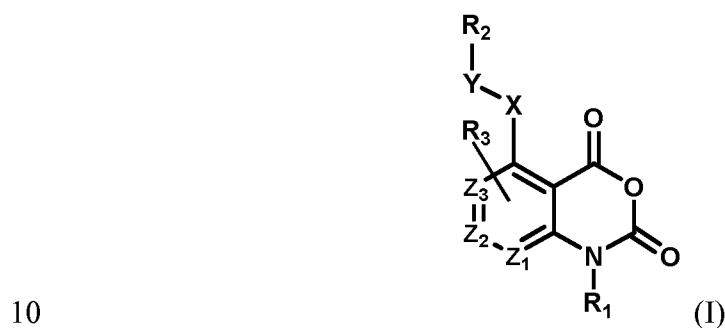
- 25
- ils sont bon marché,
 - ils sont stables,
 - ils sont solubles en milieu aqueux,
 - ils sont efficaces quant à leur vitesse de réaction, mais également quant à leur vitesse de déprotection,
- 30
- le produit de leur réaction avec une biomolécule est stable,

- ils ne nécessitent pas l'utilisation de tampon Tris pour la déprotection à chaud et/ou,
- ils ne génèrent pas de réactions secondaires indésirables.

Les réactifs décrits dans la présente demande sont ainsi particulièrement appropriés pour inactiver transitoirement des enzymes impliquées dans la polymérisation des acides nucléiques comme la *Taq* polymérase ou certaines transcriptase inverses, et plus généralement des enzymes utilisées dans les techniques de diagnostic in vitro.

RESUME

Ainsi, la présente invention a pour objet un composé de formule (I) suivante:



dans laquelle

X est une liaison covalente ou un alkyle en C₁ à C₄,

Y est un radical nucléophile, de préférence O, S, NR₄, O-NR₄, NH-O, ou NH-NR₄, et R₄ est H ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,

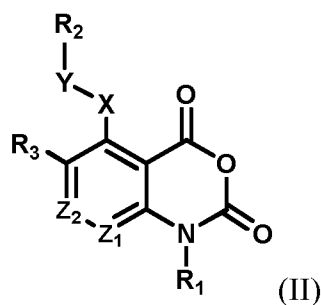
15 Z₁, Z₂, Z₃ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre, N ou C, de préférence Z₃ représente C, plus préférentiellement Z₃ est C et R₃ est en position Z₃,

R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle.

20 R₂ est un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple, un groupe *iso*-propyle, *isobutyle*, *sec*-butyle, *tert*-butyle, *isopentyle* ou 2,2-diméthylpropyle, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un groupe cyano.

- 5 Dans un mode de réalisation préféré, le composé selon l'invention est de formule (II) suivante :



Dans laquelle X, Y, Z₁, Z₂, R₁, R₂ et R₃ sont tels que définis plus haut pour la formule (I).

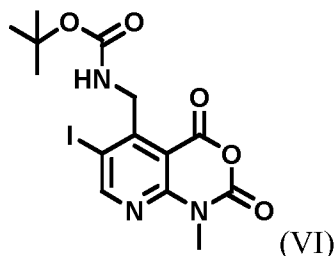
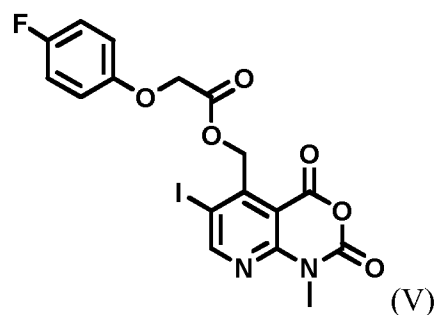
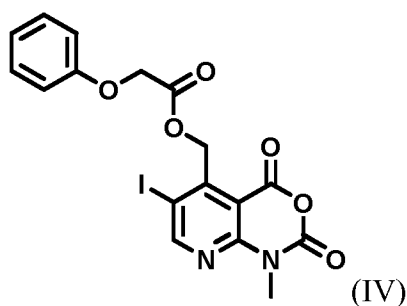
- Dans un mode de réalisation spécifique, le groupement thermolabile et/ou acidolabile R₂ dans les formules (I) et (II) ci-dessus est choisi parmi les groupements *tert*-butoxycarbonyl (BOC), phénoxyacétyle substitué ou non, trityle, méthoxytrityle, diméthoxytrityle ou citraconyle.
- 10

Dans un autre mode de réalisation particulier, qui peut être combiné avec les précédents modes de réalisation, R₁ est un groupe méthyle.

- 15 Dans un autre mode de réalisation particulier, éventuellement combiné avec les précédents modes de réalisation, R₃ est l'iode.

Dans un autre mode de réalisation particulier, qui peut être combiné avec les précédents modes de réalisation, Z₁ est N et Z₂ est C.

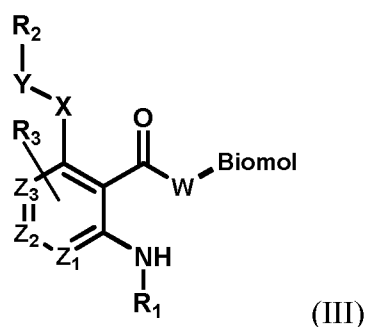
En particulier, l'invention porte sur l'un des composés de structures suivantes :



L'invention vise également un procédé de préparation d'une molécule biologique protégée, comprenant la mise en contact d'un composé selon l'invention tel que décrit ci-dessus avec
 5 une molécule biologique comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles dans des conditions permettant l'acylation d'un ou plusieurs groupes nucléophiles de ladite molécule biologique, pour former une molécule biologique protégée.

Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, la molécule biologique comprend des fonctions amines. En particulier, la molécule biologique est une protéine qui
 10 comprend des fonctions nucléophiles et notamment les fonctions amines de ses résidus lysines ou de l'acide aminé terminal, les fonctions alcools des sérines, et/ou les fonctions thiols des cystéines.

L'invention porte en particulier sur une molécule biologique protégée, et représentée par la formule (III) suivante :



15

dans laquelle

Biomol est une molécule biologique ;

W est un radical nucléophile de la molécule biologique, de préférence NH, S ou O;
et,

X est une liaison covalente ou un alkyle en C₁ à C₄,

5 Y est un radical nucléophile, de préférence O, S, NR₄, O-NR₄, NH-O, ou NH-NR₄, et R₄ est H ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,

Z₁, Z₂, Z₃ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre, N ou C, de préférence Z₃ représente C, plus préférentiellement Z₃ est C et R₃ est en position Z₃,

10 R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle,

R₂ est H ou un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

15 R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple un groupe iso-propyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl ou 2,2-diméthylpropyl, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un groupe cyano.

20 Dans un mode de réalisation spécifique, Biomol est choisie parmi les protéines et notamment, les enzymes.

Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, Biomol est une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction de polymérisation d'acide nucléique, par exemple une ADN polymérase.

25 Sont également décrits des procédés de déprotection des groupes nucléophiles d'une molécule biologique protégée par les composés selon l'invention, ledit procédé comprenant une étape de clivage du ou des groupements thermolabiles et/ou acidolabiles

R₂, par traitement thermique et/ou acide respectivement et la déprotection concomitante des groupes nucléophiles de la molécule biologique.

Ainsi, l'invention concerne également les utilisations d'un composé selon l'invention pour l'inactivation réversible d'une enzyme. Dans un mode préféré, le composé selon
5 l'invention est utilisé pour l'inactivation réversible d'une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction de polymérisation d'acide nucléique, par exemple une ADN polymérase.

L'invention vise en outre un procédé d'amplification d'un acide nucléique comprenant la mise en œuvre d'une enzyme polymérase inactivée par les composés selon l'invention, et au moins une étape de traitement thermique à une température permettant le clivage du ou
10 des groupements thermolabiles R₂ et la déprotection des groupes nucléophiles, ladite étape de traitement thermique précédant ladite étape d'amplification d'acide nucléique.

Définitions

Le terme « substitué ou non » signifie qu'un ou plusieurs hydrogène(s) présent(s) dans un groupe peut être substitué par un groupe fonctionnel, par exemple choisi parmi les groupes
15 amine, imine, nitrile, cyano, amide, imide, hydroxyle, alcoxyle, carbonyle, carboxyle, ester, thiol, thioéther, thioester et halogénure.

Le terme « un groupe alkyle en C_x à C_y » désigne une chaîne alkyle linéaire ou ramifiée, ou un cycloalkyle, ayant x à y atomes de carbone. Comme exemple de chaîne alkyle linéaire on peut citer: méthyle, éthyle, n-propyle, n-butyle, n-pentyle, n-hexyle, n-heptyle,
20 n-octyle, n-nonyle et n-décyle. Comme exemple de chaîne alkyle ramifiée, on peut citer: iso-propyle, isobutyle, sec-butyle et tert-butyle, isopentyle, 2,2-diméthylpropyle, iso-octyle, iso-nonyle et iso-décyle. Comme exemple de cycloalkyle, on peut citer cyclopentyle, cyclohexyle, cycloheptyle et cyclooctyle.

Le terme « aryle » désigne des hydrocarbures cycliques aromatiques ne comprenant pas
25 d'hétéroatomes dans le cycle. Par exemple, le groupe aryle peut comprendre entre 6 et 14 atomes de carbones dans la partie cycle aromatique. Comme exemple de group aryle, on peut citer : phényle, biphényle, phénanthrényle, pyrényle, chrysényle, anthracényle et naphthyle.

Le terme « hétérocycle » désigne un groupe comprenant au moins un cycle, saturé ou insaturé, dont au moins un des atomes du cycle est un hétéroatome, comme par exemple N, O ou S. Un hétérocycle peut être composé de plusieurs cycles condensés. Par exemple, l'hétérocycle peut comprendre entre 6 et 14 atomes dans la partie cyclique.

- 5 Le terme « acyle » désigne un groupe comprenant un groupe carbonyle, le groupe acyle étant lié à la molécule via l'atome de carbone du carbonyle. Cet atome de carbone est également lié à un autre atome de carbone appartenant à un groupe alkyle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non ou un hétérocycle substitué ou non. Par exemple, le groupe acyle comprend entre 2 et 12 atomes de carbone.
- 10 Le terme « alcényle » désigne une chaîne alkyle linéaire ou ramifiée, ou un cycloalkyle, comprenant au moins une double liaison carbone-carbone. Comme exemple de groupes alcényle, on peut citer : vinyle, $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, cyclohexényle, cyclopentényle, cyclohexadiényle, butadiényle, pentadiényle, et hexadiényle. Par exemple, le groupe alcényle comprend entre
- 15 2 et 12 atomes de carbone.

- Le terme « nucléophile » ou « groupe nucléophilique » désigne un groupe capable de former une liaison covalente avec un site réactif (électrophile) en donnant les deux électrons nécessaires à la création de la liaison, dans des conditions de réaction appropriées. Un ou plusieurs groupes nucléophiles peuvent être naturellement présents sur
- 20 une molécule biologique, par exemple le groupe amine d'une lysine, l'amine terminale d'une chaîne polypeptidique, l'alcool d'une sérine ou encore le groupe thiol d'une cystéine présente sur une protéine ou une enzyme.

- Le terme « groupement protecteur » désigne un groupe fonctionnel introduit dans une molécule à partir d'une fonction chimique pour masquer tout ou partie de sa réactivité. Le
- 25 masquage (protection) d'une fonction chimique sur la molécule améliore ainsi la sélectivité des réactions suivantes. Le terme « protection » ou « protégé » fait ainsi référence à l'état de la molécule après réaction avec un groupement protecteur. Une « molécule biologique protégée » est une molécule biologique qui présente une ou plusieurs fonctions chimiques protégées par des groupements protecteurs. S'agissant d'une enzyme, une
- 30 enzyme protégée peut alors être inactive. La déprotection fait référence à l'étape de

libération de tout ou partie des groupements protecteurs d'une molécule protégée et, de préférence, l'obtention de la molécule dans son état original, avant sa protection par les composés selon l'invention.

Le terme « groupement protecteur thermolabile » désigne un groupement protecteur qui est stable à température ambiante, par exemple entre 15°C et 25°C, et qui est clivé, dissocié ou relargué d'une molécule à laquelle il est lié, par un traitement thermique (étape de chauffage), par exemple par traitement à une température comprise entre 50 et 100°C, notamment en présence d'un tampon approprié pour le fonctionnement optimal d'une molécule biologique, par exemple, d'une enzyme.

10 Des groupements protecteurs thermolabiles incluent en particulier ceux décrits par Koukhareva et al, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 4955-4962 ; ou Trinlink Biotechnologies (WO2012/09434 et US8,133,669).

Des exemples de groupements protecteurs thermolabiles incluent de manière générale les amides, les éthers, les esters, les acétals, les carbonates, les thioéthers, les thioesters, thioacétals, thiocarbonates et notamment ceux décrits dans Koukhareva et al, *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 4955-4962 , ou encore, le monométhoxy trityle (MMT), le diméthoxy trityle (DMT), et/ou le phenoxyacétate, substitué ou non.

Le terme « groupement protecteur acidolabile » désigne un groupement protecteur qui est stable en condition neutre ou basique et qui est clivé, dissocié ou relargué, en condition acide à température ambiante, par exemple par traitement à un pH inférieur à 6,0, ou encore inférieur à 5,0. Des exemples de groupements protecteurs acidolabiles incluent en particulier le citraconyl, le *tert*-butoxycarbonyl (BOC), le benzyloxycarbonyl, le trityl (Trt), le méthoxytrityl, le diméthoxytrityl, le benzyloxymethyl (Bom) ou encore le *t*-Butoxymethyl (Bum). D'autres exemples de groupements protecteurs acidolabiles sont décrits notamment dans *Chem. Rev.*, 2009, 109 (6), pp 2455–2504 et plus particulièrement dans les pages 2467 et 2493 selon qu'il s'agit d'un groupement protecteur d'une fonction amine ou hydroxyle.

Le terme « molécule biologique » s'entend au sens large comme incluant l'ensemble des macromolécules synthétisables par des organismes biologiques. En particulier, le terme

inclut les polymères d'acides nucléiques et notamment l'ADN ou l'ARN, les polysaccharides, les peptides, polypeptides et les protéines, notamment les enzymes.

Les termes "polypeptide", "peptide", et "protéine" sont interchangeables, et font référence aux polymères ou oligomères d'acides aminés. Les acides aminés d'un tel polymère sont
5 reliés entre eux par une liaison peptidique entre un groupe carboxyl et un groupe amine de deux acides aminés. Une protéine peut comprendre plusieurs polypeptides reliés entre eux par des liaisons non-covalentes et/ou des ponts disulfures.

Au sens de l'invention, le terme "acides aminés" incluent les acides aminés naturels ou non naturels ou leurs dérivés substitués.

10 **Les Réactifs Pour la Protection de Molécules Biologiques**

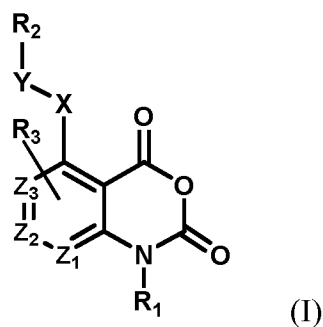
Les composés selon l'invention ou réactifs pour la protection de molécules biologiques sont des dérivés de l'anhydride isatoïque utiles pour protéger transitoirement (protection « réversible ») les groupements nucléophiles, par exemple les amines, d'une molécule biologique, par exemple une protéine.

- 15 Les composés selon l'invention réagissent avec le groupe nucléophile d'une molécule biologique et notamment d'une protéine. Par exemple, ils peuvent réagir avec l'amine ϵ d'une lysine d'une protéine (ou enzyme) ou l'amine N-terminale d'une protéine (ou enzyme), l'alcool d'une sérine d'une protéine (ou enzyme) ou encore le thiol d'une cystéine d'une protéine pour former respectivement une liaison amide, ester, ou thioester.
- 20 Parmi les fonctions nucléophiles d'une protéine ou d'une enzyme, de préférence au moins une contribue de manière essentielle au maintien de la conformation de la protéine et/ou de la fonction enzymatique. La protection de ladite fonction nucléophile essentielle (par exemple, une lysine, sérine ou cystéine) entraîne ainsi l'inactivation de la protéine ou de l'enzyme.
- 25 Avantagement, la liaison amide, ester et/ou thioester ainsi obtenue entre les molécules biologiques et les composés selon l'invention est particulièrement stable, à basse température ou température ambiante. Des molécules biologiques peuvent être rendues inactives avec les composés selon l'invention par exemple dans des conditions de stockage ou de transport à température ambiante. Plus particulièrement, il est possible de maîtriser le

point de départ d'une réaction enzymatique en induisant les conditions pour la déprotection d'une enzyme, selon le principe ci-dessous :

- Dans un premier temps, on fait réagir les composés selon l'invention par réaction d'acylation des groupements nucléophiles d'une enzyme avec le composé et on obtient une enzyme protégée.
 - Dans un deuxième temps, on déprotège par traitement acide et/ou thermique une fonction nucléophile du composé selon l'invention par clivage d'un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile présent sur le composé selon l'invention et protégeant ladite fonction nucléophile du composé selon l'invention.
 - Dans un troisième temps, on obtient la cyclisation entre la fonction nucléophile déprotégée du composé selon l'invention et le carbonyl de l'amide, l'ester ou thioester obtenu par l'acylation de l'enzyme, qui de façon concomitante permet la réversion de l'acylation, la déprotection de l'enzyme et la restauration de l'activité enzymatique.
- Sauf précision ci-après dans le texte qui suit, l'expression « composés selon l'invention » fait référence aux composés de formule (I) ci-dessous ainsi qu'à toutes leurs sous-formules spécifiquement décrites (et en particulier les formules (II) à (VI), les sels de ces composés, leurs stéréoisomères (incluant les diastéréoisomères et les énantiomères), les tautomères et les composés marqués par des isotopes (incluant les substitutions au deutérium et par des isotopes radioactifs).

Le composé selon l'invention de formule (I) ci-dessous



présente en particulier

R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle.

R₂ est un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

- 5 R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple un groupe *iso*-propyle, isobutyle, *sec*-butyle, *tert*-butyle, isopentyle ou 2,2-diméthylpropyle, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un groupe cyano.

De préférence, un seul des radicaux Z₁, Z₂ et Z₃ est N.

- 10 Dans un mode de réalisation particulier, X est un alkyle non substitué en C₁ à C₃, par exemple un méthyle.

Dans un mode de réalisation, R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, un alcényle, un groupe aryle ou un hétérocycle, lesdits groupes alkyle, alcényle, aryle, ou hétérocycle, étant éventuellement substitués par un ou plusieurs groupes fonctionnels choisis parmi nitrile,

- 15 cyano, amide, imide, alcoyle, carbonyle, carboxyle, ester, thioéther, thioester et halogénure.

Dans un mode de réalisation, R₁ est un groupe alkyle en C₁ à C₆, éventuellement substitués par un ou plusieurs groupes fonctionnels choisis parmi nitrile, cyano, amide, imide, alcoyle, carbonyle, carboxyle, ester, thioéther, thioester et halogénure.

- 20 Dans un mode de réalisation, R₂ est un groupement protecteur choisi parmi les amides, les éthers, les esters, les acétals, les carbonates, les thioéthers, les thioesters, les thioacétals, les thiocarbonates, le monométhoxy trityle (MMT), le diméthoxy trityle (DMT), le phenoxyacétate substitué ou non, le citraconyl, le *tert*-butoxycarbonyl (BOC), le benzyloxycarbonyl, le trityl (Trt), le méthoxytrityl, le diméthoxytrityl, le benzyloxymethyl
25 (Bom) ou le t-Butoxymethyl (Bum).

Dans un mode de réalisation, R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂, un groupe aryle, un hétérocycle, un groupe acyle, un groupe alcényle, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un

groupe cyano, lesdits groupes alkyle, aryle, hétérocycle ou alcényle étant éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes fonctionnels choisis parmi les groupes nitrile, cyano, amide, imide, alcoxyle, carbonyle, carboxyle, ester, thioéther, thioester et halogénure.

- Dans un mode de réalisation, R_3 est un groupe alkyle en C_1 à C_{12} ou un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ledit groupe alkyle étant éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes fonctionnels choisis parmi les groupes nitrile, cyano, amide, imide, alcoxyle, carbonyle, carboxyle, ester, thioéther, thioester et halogénure.

R_3 est placé de sorte à favoriser la cinétique de cyclisation. Par exemple, dans un mode de réalisation, R_3 est de préférence en position 6.

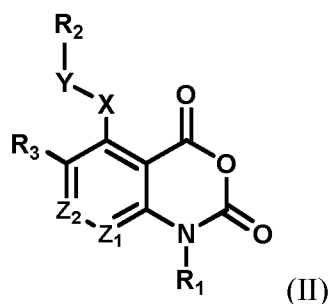
- 10 Dans un mode de réalisation particulier, R_3 est un groupe *tert*-butyle, un groupe *iso*-propyle, un groupe cyano ou un atome d'iode.

- Dans un mode de réalisation particulier, Y est différent de S-S. Dans un autre mode de réalisation particulier, le radical divalent nucléophile Y est choisi parmi O, S, NR_4 , $O-NR_4$, $NH-O$, $NH-NR_4$, $C(O)-O-NR_4$, $C(O)-NH-O$, $C(O)-NH-NR_4$, $O-C(O)-NH-NR_4$, $NH-C(O)-NH-NR_4$, $O-C(O)-NH-O$, $NH-C(O)-NH-O$, $O-C(O)-O-NR_4$, $NH-C(O)-O-NR_4$, $C(O)-S$ et R_4 est H ou un groupe alkyle en C_1 à C_4 .

Dans un mode de réalisation, le nombre d'atome X + Y linéaire, c'est-à-dire le nombre d'atome sur la chaîne principale reliant le cycle à R_2 (les différents substituants H ou R_4 n'étant pas pris en compte), est supérieur ou égal à 2, par exemple compris entre 2 et 4.

- 20 De préférence, Y est choisi parmi O, S et NH. Dans ce cas, X n'est pas une liaison.

Dans un autre mode de réalisation préféré, Y est choisi parmi O, S et NR_4 , et X n'est pas une liaison. Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, le composé selon l'invention est de formule (II) suivante :



Dans un mode de réalisation spécifique, le groupement thermolabile ou acidolabile R_2 dans les formules (I) et (II) ci-dessus est choisi parmi les groupements *tert*-butoxycarbone (BOC), phénoxyacétyle substitué ou non, trityle, méthoxytrityle, diméthoxytrityle ou
 5 citraconyle.

Le caractère thermolabile des groupements phénoxyacétate a été démontré par Lebedev A. *et al.* (Koukhareva I., Lebedev A. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 4955-4962). Dans un mode de réalisation particulier, le groupement protecteur R_2 est le groupement protecteur thermolabile phénoxyacétyle, substitué ou non, de préférence, il s'agit d'un
 10 phénoxyacétyle substitué par un halogène, par exemple le fluorophénoxyacétyle.

L'homme du métier sera à même d'identifier d'autres groupements protecteurs R_2 thermolabiles et/ou acidolabiles particulièrement adaptés à la fonction recherchée comme décrit par exemple dans WO2012/094343, US8,133,669, ou dans les livres suivants :

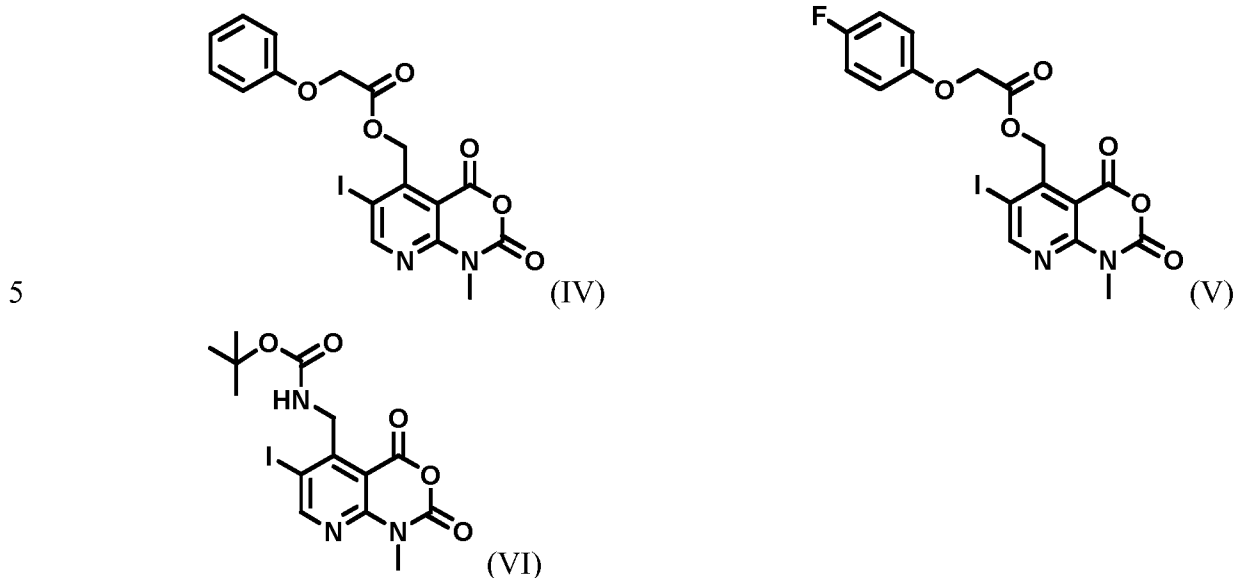
- Greene's Protective Groups in Organic Synthesis de Peter G. M. Wuts Editeur :
 15 Wiley-Blackwell; Édition : 5th Edition (23 décembre 2014) ou
- Protecting Groups de P.J. Kocienski Editeur : Thieme Publishing Group; Édition :
 3rd Revised edition (1 janvier 2005).

Dans un autre mode de réalisation particulier du composé selon la formule (II), qui peut être combiné avec les précédents modes de réalisation, R_1 est un groupe méthyle.

20 Dans un autre mode de réalisation particulier du composé selon la formule (II), éventuellement combiné avec les précédents modes de réalisation, R_3 est un halogène, par exemple, l'iode.

Dans un autre mode de réalisation particulier du composé selon la formule (II), qui peut être combiné avec les précédents modes de réalisation, Z_1 est N et Z_2 est C.

En particulier, l'invention porte sur l'un des composés de structures suivantes, également décrits en exemples :



Procédé de préparation des composés selon l'invention

Les composés selon l'invention peuvent être aisément synthétisés selon les procédés décrits en exemples ou d'autres procédés de synthèse connus dans l'état de la technique.

- 10 Par exemple, certains des composés selon l'invention de formule (II) peuvent être synthétisés à partir du composé hydroxylé précurseur 6 dont la synthèse est décrite en exemple 1. Le composé précurseur 6 peut ensuite être modifié par réaction d'un groupement thermolabile ou acidolabile R_2 sur la fonction hydroxyle du précurseur. Il est également possible de faire réagir sur ces composés précurseurs ou leurs dérivés les
- 15 groupements R_1 et/ou R_3 par des méthodes conventionnelles de chimie. Le composé selon l'invention de formule (II) peut être finalement obtenu par cyclisation par substitution nucléophile, comme décrit par exemple à l'étape (i) du schéma 3 en Exemple 1 ci-dessous pour donner les composés selon l'invention.

Procédé de protection de molécules biologiques

Les composés selon l'invention sont utiles pour la protection, la modification ou l'inactivation réversible des enzymes, des protéines et plus généralement de molécules biologiques comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles, par exemple, des molécules
5 biologiques comprenant une ou plusieurs amines.

L'invention vise notamment un procédé de préparation d'une molécule biologique comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles protégés, comprenant la mise en contact d'un composé selon l'invention tel que décrit ci-dessus avec une molécule biologique dans des conditions permettant l'acylation d'un ou plusieurs groupes nucléophiles de ladite
10 molécule biologique, pour former une molécule biologique comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles protégés (également appelée ci-après « molécule biologique protégée »).

L'acylation se fait par substitution nucléophile sur une des fonctions carbonyle de l'anhydride avec addition du groupe nucléophile de la molécule biologique et élimination
15 de CO₂.

Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, la molécule biologique comprend des fonctions amines. En particulier, la molécule biologique est une protéine qui comprend les fonctions ε-amines de résidus lysines ou amine de l'acide aminé terminal. Dans ces modes de réalisation, l'acylation des fonctions ε-amines de résidus lysines ou de
20 l'amine terminale permet de former des liaisons amides très stables, en particulier dans des conditions de stockage à long terme (par exemple sur plus de 24 heures, voire plusieurs jours à température ambiante).

A titre d'illustration, la réaction d'acylation est représentée dans le schéma 1 ci-dessous avec un réactif préféré de formule (II) dans laquelle R₁ est un groupe méthyle, Z₁ est N, Z₂
25 est C et R₃ est un atome d'iode.

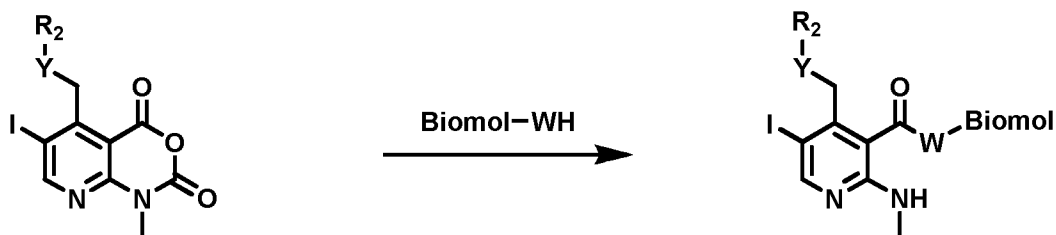


Schéma 1 : Réaction d'acylation du composé selon l'invention sur une molécule biologique

Dans le cas où la molécule biologique comprend plusieurs groupes nucléophiles à protéger, on pourra ajuster la quantité de réactifs utilisée en fonction du degré de modification (protection) souhaité. En particulier, dans le cas d'une enzyme, avantageusement, le degré de modification souhaité correspond au seuil de modification au-delà duquel l'enzyme est inactivée. Ce seuil peut se déterminer de manière empirique par de simples essais.

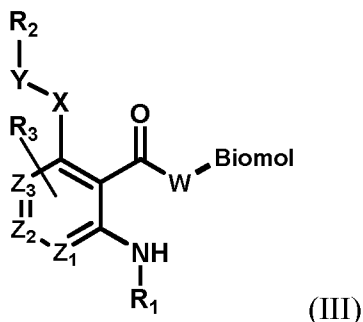
Le tampon utilisé pour la réaction de protection est en général un tampon avec un pH compris entre 6 et 9, de préférence entre 7 et 9, plus préférentiellement entre 7 et 8. Des exemples de tampons incluent notamment les tampons phosphates, et les tampons non nucléophiles opérant dans cette zone de pH, pouvant contenir jusqu'à 50% de DMSO. De tels tampons sont connus de l'homme du métier comme indiqué dans <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers.html>

La réaction d'acylation, notamment d'acylation d'une enzyme avec au moins un composé de formule (I) ou (II) est de préférence obtenue dans un tampon phosphate, par exemple à pH 7,4.

Le procédé de protection est de préférence mis en œuvre à une température comprise entre 4°C et 40°C, par exemple une température comprise entre 4°C et 25°C.

Les molécules biologiques comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles protégés, susceptibles d'être obtenus par le procédé ci-dessus font également partie de la présente invention. En particulier, une enzyme peut comprendre plusieurs groupements amines protégées du fait de la présence de multiples lysines dans sa séquence polypeptidique, ou encore des groupes OH ou SH du fait de la présence de sérine ou cystéine respectivement.

L'invention porte par conséquent sur une molécule biologique protégée, et représentée par la formule (III) suivante :



dans laquelle

5 Biomol est une molécule biologique,

W est un groupe nucléophile de la molécule biologique, de préférence NH, S ou O,

X est une liaison covalente ou un alkyle en C₁ à C₄,

Y est un radical nucléophile, de préférence O, S, NR₄, O-NR₄, NH-O, ou NH-NR₄, et R₄ est H ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,

10 Z₁, Z₂, Z₃ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre, N ou C, de préférence Z₃ représente C, plus préférentiellement Z₃ est C et R₃ est en position Z₃,

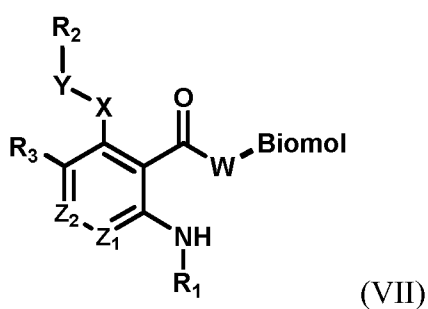
15 R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle,

R₂ est H ou un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

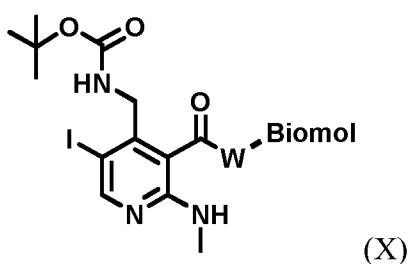
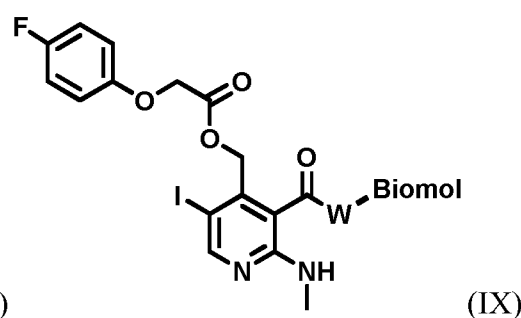
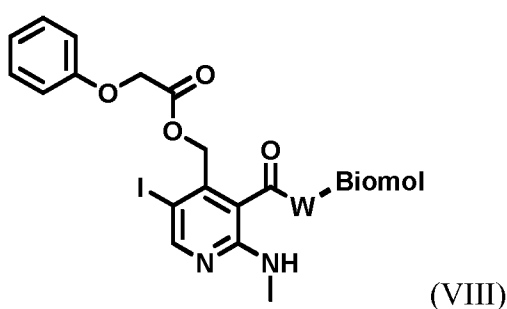
20 R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple un groupe iso-propyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl ou 2,2-diméthylpropyl, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un groupe cyano.

Bien entendu, lorsque la molécule biologique comprend plusieurs groupes nucléophiles, par exemple une protéine comprenant plusieurs lysines, une même molécule biologique peut comprendre tout ou partie de ces groupes nucléophiles ainsi protégés par acylation avec le réactif selon l'invention.

- 5 En particulier, lorsque le réactif de formule (II) est mis à réagir avec une molécule biologique comprenant un ou plusieurs groupes nucléophile, on obtient une molécule biologique protégée de formule (VII) suivante :



- En choisissant l'un des réactifs de formule (IV), (V) et (VI) ci-dessus, on obtient des molécules biologiques protégées selon l'une des formules (VIII), (IX) et (X) respectivement.
- 10



- Dans un mode de réalisation spécifique, la molécule biologique (ou Biomol) est choisie parmi les enzymes.
- 15

Le procédé est applicable à tout type d'enzyme. Parmi les enzymes d'intérêt, on citera plus particulièrement les enzymes utilisées dans les techniques de biologie moléculaire, pour l'ingénierie génétique ou la polymérisation des acides nucléiques, et plus particulièrement les enzymes utilisées dans les techniques de diagnostic in vitro.

- 5 Ces enzymes comprennent, à titre d'illustration, les lipases, les protéases, les glycolases ou les nucléases.

En particulier, les enzymes d'intérêt comprennent les enzymes de restriction, les ligases, les ARN polymérases, les ADN polymérases, tels que les l'ADN polymérase I, II ou III, ou l'ADN polymérase α , β , ou γ , la terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT) ou la
10 télomérase, l'ARN polymérase ADN dépendante, la primase, ou encore l'ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

Dans un mode de réalisation plus particulièrement préféré, la molécule biologique selon l'invention est une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction de polymérisation d'acide nucléique, par exemple une ADN polymérase. Les polymérases utilisables pour la
15 polymérisation des acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. La réaction de polymérisation est en particulier une réaction de polymérisation dans le cadre d'une amplification par polymérisation en chaîne (PCR).

Dans un mode de réalisation, une enzyme d'intérêt mise en œuvre dans le procédé de protection selon l'invention est choisie parmi les polymérases suivantes : l'ADN
20 polymérase T7, l'ADN polymérase Kornberg, l'ADN polymérase Klenow, l'ADN polymérase Taq, l'ADN polymérase Micrococcal, l'ADN polymérase alpha, l'ADN polymérase Pfu, la transcriptase inverse AMV, la transcriptase inverse MMLV, l'ARN polymérase d'E.coli, l'ARN polymérase SP6, T3 ou T7. En particulier, dans un mode de réalisation, des ADN polymérases thermostables et/ou présentant une activité exonucléase
25 (par exemple 3'5' exonucléase) sont utilisées dans le procédé selon l'invention pour préparer des polymérases protégées.

Ces polymérases ainsi protégées sont plus particulièrement utiles pour des applications de démarrage à chaud « Hot-Start ». La protection des polymérases empêche l'amplification non-spécifique d'ADN à basse température et favorise ainsi une meilleure efficacité de la

réaction d'amplification, l'enzyme étant déprotégée uniquement à haute température, par clivage du groupement thermolabile.

Parmi ces polymérase thermostables, on citera notamment celles qui ne sont pas sujettes à une dénaturation de leur structure et/ou une inactivation de leur activité enzymatique entre 50 °C et 100°C, celles qui fonctionnent et sont actives une fois qu'elles sont déprotégées, entre 50°C et 100°C. Plus particulièrement, les polymérase : TAQ Polymerase et KLen TAQ polymerase.

D'autres enzymes thermostables peuvent être dérivées des organismes biologiques suivants : *Thermus antranikianii*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Anaerocellum thermophilum*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus*, etc..

15 **Procédés d'utilisation des composés selon l'invention**

Les molécules biologiques protégées selon la présente invention peuvent être avantageusement déprotégées par un simple traitement thermique et/ou acide selon groupement R₂ choisi.

Le principe de la déprotection par traitement thermique ou acide est décrit dans le schéma 2 qui suit avec une molécule biologique (enzyme) protégée, selon la formule (VII) dans laquelle R₁ est un groupe méthyle, Z₁ est N, Z₂ est C et R₃ est un atome d'iode:

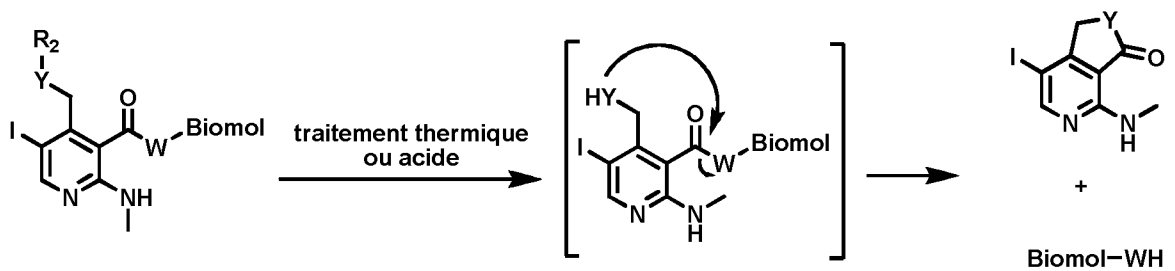


Schéma 2 : Exemple de procédé de déprotection d'une molécule biologique protégée selon l'invention

Un traitement thermique ou acide permet de libérer la fonction nucléophile du composé selon l'invention par clivage du groupement thermolabile ou acidolabile. Cette fonction nucléophile ainsi libérée peut alors permettre la réversion de l'acylation par cyclisation et déprotection de la molécule biologique. Avantagusement, le sous-produit généré par la

5 réaction de déprotection n'est pas réactif. De plus, la présente réaction de déprotection ne nécessite pas l'emploi d'un tampon Tris, ou d'un tampon qui génère des conditions acides à haute température. En particulier, l'étape de déprotection peut être effectuée par traitement thermique dans des conditions de pH compris entre 6,5 et 9,5, de préférence entre 8 et 9,0, plus préférentiellement encore entre 8,5 et 9,0.

10 Ainsi, sont également décrits des procédés de déprotection des groupes nucléophiles d'une molécule biologique protégée par les composés selon l'invention, ledit procédé comprenant une étape de clivage du ou des groupements thermolabiles et/ou acidolabiles R_2 , par traitement thermique et/ou acide respectivement, et la déprotection concomitante des groupes nucléophiles.

15 Un des avantages du procédé décrit ci-dessus est qu'il permet d'inactiver des enzymes. Par « inactivation » il faut comprendre que l'activité catalytique d'une enzyme protégée par le procédé de l'invention est fortement réduite voire nulle par rapport à son activité catalytique avant protection dans des conditions optimales d'activité.

Le procédé de déprotection décrit ci-dessus permet alors de restaurer l'activité

20 enzymatique des enzymes protégées.

Ainsi, l'invention concerne également les utilisations d'un composé selon l'invention pour l'inactivation réversible d'une enzyme. Dans un mode préféré, le composé selon l'invention est utilisé pour l'inactivation réversible d'une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction d'amplification d'acide nucléique, par exemple une polymérase.

25 L'invention est particulièrement appropriée pour des applications de démarrage à chaud (« Hot Start ») des enzymes, par exemple les polymérases utilisées dans une réaction d'amplification d'acide nucléique (réaction dites « PCR »).

Par conséquent, l'invention vise également un procédé d'amplification d'un acide nucléique comprenant (i) la mise en œuvre d'une enzyme polymérase protégée ou

inactivée par les composés selon l'invention, (ii) au moins une étape pour la déprotection de la polymérase, par exemple par un traitement thermique à une température permettant le clivage du ou des groupements thermolabiles R₂, (iii) une étape d'amplification d'acide nucléique à l'aide de la polymérase déprotégée à l'étape (ii).

- 5 Dans un mode de réalisation spécifique, le procédé d'amplification est mis en œuvre à l'aide d'une ADN polymérase, telle que la Taq polymérase, la Pfu polymérase, la T7 polymérase, le fragment Klenow d'ADN polymérase d'E. coli et/ou une transcriptase inverse, ou tout autre polymérase telle que décrite plus haut.

- Dans un autre mode de réalisation qui peut être combiné avec le précédent, le procédé
10 d'amplification est une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (réaction PCR), bien connue de l'homme du métier. Le protocole PCR comprend par exemple, 20 à 40 cycles, chaque cycle comprenant au moins (i) une phase de dénaturation de l'ADN à amplifier à une température généralement comprise entre 90°C et 95°C, (ii) une phase d'hybridation des amorces avec l'ADN à amplifier à une température généralement
15 comprise entre 55°C et 65°C et (iii) une phase d'extension à une température généralement comprise entre 68°C et 75°C.

- La polymérase protégée selon l'invention est dans ce cas de préférence une polymérase thermostable protégée, par exemple une *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymérase protégée, une Pfu (*Pyrococcus furiosus*) polymérase protégée, Vent ou Tli (*Thermococcus litoralis*)
20 polymérase protégée ou leurs variantes, notamment recombinantes. De préférence, un nombre suffisant d'amines de ladite polymérase sont protégées de sorte que la polymérase protégée est inactive ou quasi-inactive à température ambiante et peut être déprotégée à une température équivalente ou supérieure à la température d'hybridation des amorces (primer) utilisées pour l'amplification PCR.

- 25 Les enzymes et polymérases protégées selon l'invention sont également avantageusement mises en œuvre dans des variantes de procédés d'amplification nucléique par PCR. On citera en particulier la PCR emboîtée (Nested PCR), les PCR quantitatives (ou qPCR), semi-quantitatives ou temps réel, les PCR « error-prone », ou la PCR après transcription inverse (RT-PCR).

Kits et Trousses de mise en œuvre

L'invention vise également des kits ou trousse de mise en œuvre comprenant les enzymes protégées selon l'invention, et éventuellement des réactifs, des tampons, des contrôles et/ou une notice d'instructions de mise en œuvre.

- 5 En particulier, l'invention concerne une trousse pour l'amplification d'acide nucléique en démarrage à chaud « Hot-start », comprenant
- i) une ADN polymérase thermostable protégée selon l'invention, par exemple de formule (III), (VII), (VIII), (IX) ou (X) dans lesquelles Biomol est une ADN polymérase thermostable,
 - 10 ii) le cas échéant, des réactifs de détection d'acide nucléique, par exemple un réactif fluorescent,
 - iii) le cas échéant, un tampon, des dNTP...

Ces kits sont utiles notamment pour la mise en œuvre de procédés d'amplification tel que décrits ci-dessus.

- 15 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples détaillés ci-dessous et au regard des figures annexées.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Suivi par HPLC du clivage du dérivé aza-anthranylate phénoxyacétate **10** et de la libération de phényléthylamine.

- 20 **Figure 2** : Suivi par HPLC du clivage du dérivé aza-anthranylate fluoro-phénoxyacétate **14** et de la libération de phényléthylamine.

Figure 3 : Suivi par HPLC du clivage du dérivé aza-anthranylate N-Boc **19** et de la libération de phényléthylamine.

- Figure 4**: Acylation de l'hémoglobine par le composé **13** utilisé à différentes
25 concentrations.

Figure 5: Réversion de l'acylation de l'hémoglobine suite à un traitement thermique.

Figure du haut (A) : Hémoglobine dans GuHC 8M

Figure du milieu (B) : Hémoglobine acylée par le composé **13** puis reprise dans GuHCL 8M

Figure du bas (C) : Hémoglobine acylée par le composé **13** puis chauffée à 95°C dans du
5 Tris pH9 et reprise dans GuHCl 8M.

Figure 6: Inactivation de la *Taq* polymerase suite à son acylation par le composé **13** et
restauration de son activité après traitement thermique à 95°C pendant 15 min dans des
conditions de PCR (expériences réalisées en duplicat, la moyenne est représentée). En
pointillé clair à gauche : sans activation ; en pointillé grisé à droite : après 15 minutes
10 d'activation à 95°C.

EXEMPLES

Dans les exemples décrits ci-après, les abréviations suivantes seront utilisées :

- ACN : Acétonitrile,
- AcOEt : acétate d'éthyle,
- 15 • Boc₂O : dicarbonate de di-*tert*-butyle,
- CCM : chromatographie sur couche mince,
- CDCl₃ : Chloroforme deutéré,
- d : doublet,
- DCM : dichlorométhane,
- 20 • dd : doublet dédoublé,
- DMF : diméthylformamide,
- DMSO: diméthylsulfoxyde,
- DMSO-*d*₆ : diméthylsulfoxyde deutéré,
- Eau MilliQ : Eau ultrapure (Millipore, Molsheim, France),
- 25 • EDC : N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- éq : équivalents,
- EP : éther de pétrole,
- Et₂O : éther diéthylique,
- HPLC : chromatographie liquide haute performance,
- 30 • LCMS : Appareil de chromatographie liquide couplé à un spectromètre de masse
- HOBt : hydroxybenzotriazole,

- IA : anhydride isatoïque,
 - m : multiplet,
 - nd : non déterminé,
 - NIS : *N*-iodosuccinimide,
- 5
- q : quadruplet,
 - Rdt : rendement,
 - Rf ou TR : temps de rétention,
 - RMN : résonance magnétique nucléaire,
 - s : singulet,
- 10
- t : triplet,
 - ta : température ambiante
 - TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle
 - TEA : triéthylamine
 - THF : tétrahydrofurane.

15 Conditions générales

Les conditions générales pour l'analyse et la synthèse des composés chimiques utilisées dans les exemples ci-après sont décrites ci-dessous:

- Les analyses LC-MS ont été effectuées avec une chaîne HPLC WATERS Alliance 2795 équipée d'un détecteur à barrette de diodes PDA 996 (Waters), d'un détecteur par spectrométrie de masse ZQ 2000 (Waters), d'un logiciel Empower version 2 et d'une
- 20 colonne WATERS XTerra MS C18 (4,6 x 30 2,5 µm) utilisée avec un débit de 1 ml/minute à 30°C (détection à 260 nm ou en max plot). Le spectromètre de masse ZQ 2000 possède une source d'ionisation Electrospray. Les ionisations ont été réalisées en mode positif avec une tension de cône de 20V et une tension au niveau du capillaire de 3,5kV.

Les conditions utilisées pour les analyses HPLC sont les suivantes:

Eluant A	Eluant B	Eluant C (Formiate d'ammonium : AF)	Gradient linéaire
Eau milliQ	ACN	AF 500 mM, pH 7	98% de A / 0% de B à 24% de A / 74% de B en 18 min avec 2% de l'éluant C en mode isocratique

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Jeol Lambda 400 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant pris comme référence interne (CDCl_3 : 7,26 ppm ; DMSO-d_6 : 2,49 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations ci-dessus : s, d, t, q, qu et m. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz).

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice Macherey-Nagel Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm / 70-230 mesh ou Merck LiChroprep[®] RP-18 40-63 μm .

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques Macherey-Nagel POLYGRAM[®] SIL G/UV254, 0,20 mm ou ALUGRAM[®] RP-18 W/UV254 0,15 mm.

Exemple 1 : Synthèse d'une molécule d'anhydride aza-isatoïque selon l'invention dotée d'un groupement protecteur thermolabile O-phénoxyacétate (9) (correspondant au composé IV)

On décrit dans cet exemple la synthèse d'un composé selon l'invention (selon le schéma 3). Un premier composé hydroxylé précurseur **6** est tout d'abord synthétisé en 6 étapes. Il peut servir de composé de départ pour la synthèse d'autres composés selon l'invention. Le composé **6** est alors phénoxyacétylé pour donner le composé **7**, puis iodé pour donner le composé **8** et enfin cyclisé afin d'obtenir le composé **9** aza-isatoïque attendu à même de réagir avec une protéine ou tout autre molécule biologique pour la protéger de façon transitoire.

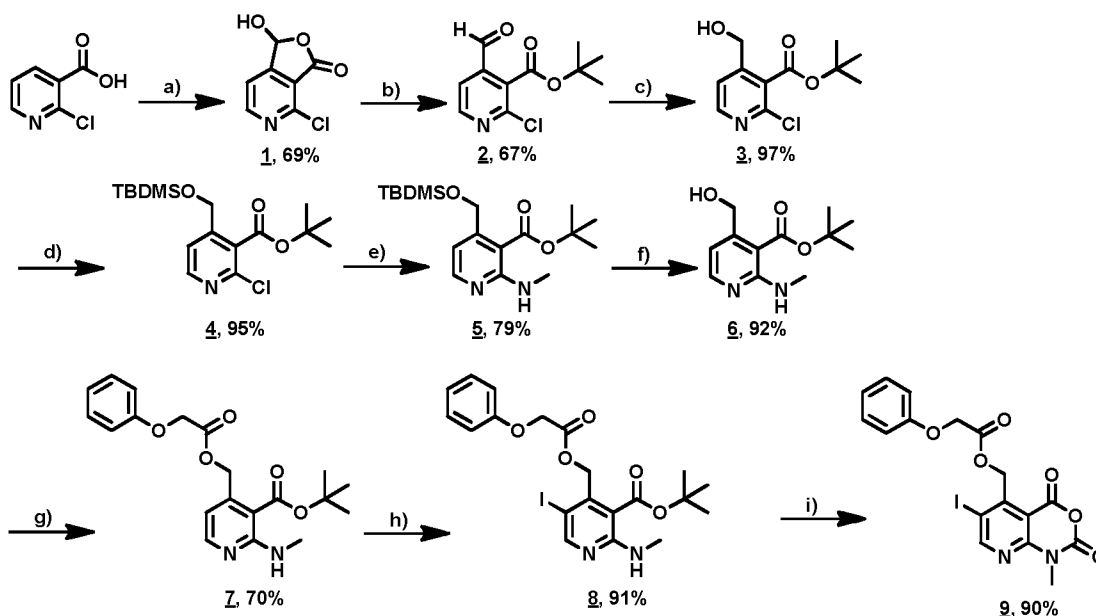
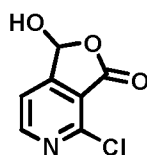


Schéma 3 : Synthèse du composé **9** O-phenoxyacétylé . a) LiTMP, THF, 3h, -50°C; DMF, 1h30, -80°C à ta; HCl pH2. b) NEt₃, DCM, 10 min, ta; t-BuBr, Ag₂O, 2h, ta. c) NaBH₄, EtOH, 30 min, -10°C. d) TBDMSCl, imidazole, DCM, 4h, ta. e) MeNH₂, H₂O, t-BuOH, 24 h, 100°C. f) TBAF, AcOH, DCM, 15h, ta. g) chlorure de phénoxyacétyle, HOBT, DCM, 5 min, ta puis **6**, 24h, ta. h) NIS, DCM, AcOH, 2-3h, ta i) COCl₂, TEA, Et₂O, 30 min, ta.

Exemple 1.1: Synthèse du 4-chloro-1-hydroxyfuro[3,4-c]pyridine-3(1H)-one (**1**)



M = 185,56 g/mole

10

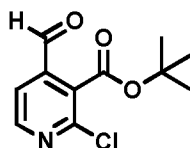
Dans un tube de Shlenk de 500 mL sous azote, 19,30 mL de 2,2,6,6-tétraméthylpiperidine (114,24 mmoles, 3 éq) sont mis en solution dans 150 mL de THF. A -10°C, 60,13 mL de *n*-BuLi (1.9 M dans l'hexane, 114,24 mmoles, 3 éq) sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 10 min. A -80 °C, 6,00 g d'acide 2-chloronicotinique (38,08 mmoles, 1 éq) sont ajoutés et la réaction est laissée sous agitation pendant 3h à -50°C. 17,69 mL de DMF (228,48 mmoles, 6 éq) sont alors introduits à -80°C et le mélange

réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h30. Après retour à température ambiante, 100 mL d'eau sont ajoutés et la solution est extraite avec de l'AcOEt (3x150 mL). La phase aqueuse est ensuite acidifiée à pH 2 avec une solution d'HCl concentrée puis extraite avec de l'AcOEt (3x200 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur
 5 MgSO₄, filtrées et enfin évaporées. L'huile obtenue est ensuite purifiée sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (DCM à DCM/AcOEt 85/15).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 69% (4,88 g, 26,30 mmoles).

Pf = 191-193°C; **IR (KBr)**: ν , 3100 (OH), 2913, 2766, 1776 (C=O), 1609, 1584, 1408,
 10 1194, 1136, 1093, 1047, 925, 755 cm⁻¹; **RMN ¹H (400MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 6,67 (bs, 1H); 7,79 (d, 1H, ³*J* = 5,0 Hz); 8,50 (bs, 1H); 8,74 (d, 1H, ³*J* = 5,0 Hz); **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 96,9; 118,8; 120,4; 147,0; 154,6; 159,3; 164,6.

Exemple 1.2: Synthèse du 2-chloro-4-formylnicotinate de tert-butyle (**2**)



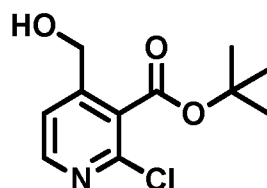
15



M = 241,67 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, à température ambiante, sont introduits 3,50 g de **1** (18.86 mmoles, 1 éq), 35 mL de DCM et 2,62 mL de TEA (18.86 mmoles, 1 éq). Le mélange est laissé sous agitation pendant 10 min à température ambiante. 8,54 mL de *t*-BuBr (75.45
 20 mmoles, 4 éq) et 8,74 g d'Ag₂O (37.72 mmoles, 2 éq) sont alors ajoutés par portions à 0°C. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le mélange est filtré sur célite, évaporé et purifiée sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (cyclohexane/AcOEt 95/5 à cyclohexane/AcOEt 90/10). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 67% (3.07 g, 12,70 mmoles).

25 **Pf** = 97-99°C; **IR (KBr)**: ν , 3077, 1732 (C=O), 1708 (C=O), 1578, 1370, 1294, 1261, 1178, 1133, 847 cm⁻¹; **RMN ¹H (400MHz, CDCl₃)**: δ 1,64 (s, 9H); 7,65 (d, 1H, ³*J* = 5,0 Hz); 8,65 (d, 1H, ³*J* = 5,0 Hz); 10,06 (s, 1H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)**: δ 27,9 (3C); 85,1; 121,0; 130,1; 140,6; 149,1; 150,9; 163,0; 188,2.

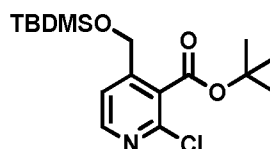
Exemple 1.3: Synthèse du 2-chloro-4-(hydroxyméthyl)nicotinate de tert-butyle (3)

$$M = 243,69 \text{ g/mole}$$

- 5 Dans un ballon de 100 mL, 3,00 g de **2** (12,41 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 35 mL d'EtOH. A -10°C , 0,51 g de NaBH_4 (13,65 mmoles, 1,1 éq) sont ajoutés par portions et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 30 min. 50 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec du DCM (3x75 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, lavées avec une solution saturée en NaCl (2x50 mL), séchées sur
- 10 MgSO_4 et évaporées.

Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 97% (2.94 g, 12,06 mmoles).

- Pf** = 122-124°C; **IR (KBr)**: ν , 3263 (OH), 3003, 2980, 1717 (C=O), 1592, 1387, 1365, 1299, 1170, 1131, 1080, 1063, 869, 846 cm^{-1} ; **RMN ^1H (400MHz, CDCl_3)**: δ 1,60 (s, 9H); 2,89 (t, 1H, $^3J = 6,3$ Hz); 4,69 (d, 2H, $^3J = 6,3$ Hz); 7,39 (d, 1H, $^3J = 5,0$ Hz); 8,37 (d, 1H, $^3J = 5,0$ Hz); **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)**: δ 27,9 (3C); 61,3; 84,3; 120,6; 128,6; 147,2; 149,8; 150,8; 164,8.

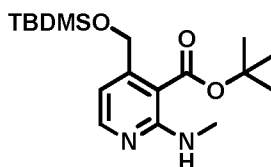
Exemple 1.4: Synthèse du 4-(((tert-butyl diméthylsilyl)oxy)méthyl)-2-chloronicotinate de tert-butyle (4)

$$M = 357,95 \text{ g/mole}$$

Dans un ballon de 100 mL à température ambiante, sont introduits 2,25 g de **3** (9,23 mmoles, 1 éq), 30 mL de DCM, 1,88 g d'imidazole (27,70 mmoles, 3 éq) et 2,78 g de TBDMSCl (18,47 mmoles, 2 éq). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 4h à température ambiante. 50 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec du DCM (3x75 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, lavées avec une solution saturée en NaCl (2x50 mL), séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/Et₂O 95/5). Le produit final est obtenu sous forme d'huile incolore avec un rendement de 95% (3,15 g, 8,80 mmoles).

10 **IR (KBr):** ν , 2956, 2931, 2859, 1717 (C=O), 1584, 1369, 1291, 1259, 1168, 1127, 840 cm⁻¹; **RMN ¹H (400MHz, CDCl₃):** δ 0,10 (s, 6H); 0,94 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 4,74 (s, 2H); 7,50 (d, 1H, ³J = 5,0 Hz); 8,39 (d, 1H, ³J = 5,0 Hz); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ -5,6 (2C); 18,2; 25,7 (3C); 27,9 (3C); 61,1; 83,6; 119,7; 127,6; 146,7; 149,7; 151,0; 164,1.

Exemple 1.5: Synthèse du 4-(((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)méthyl)-2-méthylamino) nicotinate de tert-butyle (**5**)



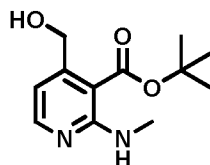
M = 352,54 g/mole

Dans un tube scellé à température ambiante sont introduits 4,00 g de **4** (11,17 mmoles, 1 éq), 15 mL de *t*-BuOH et 4,83 mL de MeNH₂ (40% w/w dans H₂O, 55,87 mmoles, 5 éq). Le mélange réactionnel est alors laissé sous agitation pendant 24h à 100°C. Après évaporation, 50 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec du DCM (3x75 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/Et₂O 90/10).

Le produit final est obtenu sous forme d'huile incolore avec un rendement de 79% (3,10 g, 8,79 mmoles).

IR (KBr): ν , 3377 (N-H), 2931, 2857, 1732 (C=O), 1584, 1370, 1291, 1259, 1190, 1169, 1127, 1112, 839 cm^{-1} ; **RMN ^1H (400MHz, CDCl_3):** δ 0,11 (s, 6H); 0,96 (s, 9H); 1,59 (s, 9H); 3,02 (d, 3H, $^3J = 4,9$ Hz); 4,90 (s, 2H); 6,97 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz); 7,87 (bs, 1H); 8,25 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz); **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ -5,4 (2C); 18,4; 25,9 (4C); 28,4 (3C); 63,9; 82,2; 104,9; 109,0; 151,8; 154,6; 159,5; 167,8.

Exemple 1.6: Synthèse du 4-(hydroxyméthyl)-2-(méthylamino)nicotinate de tert-butyle (6)



M = 238,28 g/mole

10 Dans un ballon de 100 mL, 3,00g de **5** (8,51 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 30 mL de DCM. 0,97 mL d'AcOH (17,02 mmoles, 2 éq) et 17,02 mL de TBAF (1M dans le THF, 17,02 mmoles, 2 éq) sont ajoutés simultanément. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 15h. 70 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec du DCM (3x70 mL). Les phases organiques sont alors

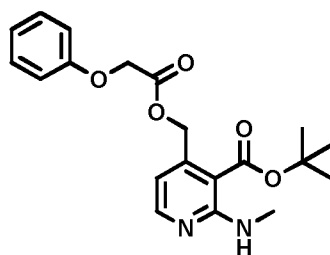
15 rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP/AcOEt 80/20 à EP/AcOEt 60/40).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 92% (1,86 g, 7,81 mmoles).

20 **IR (KBr):** ν , 3348 (N-H), 3242 (O-H), 2980, 2944, 1667 (C=O), 1596, 1557, 1530, 1367, 1242, 1165, 1126, 1074, 1061, 805 cm^{-1} ; **RMN ^1H (400MHz, CDCl_3):** δ 1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, $^3J = 4,9$ Hz); 4,73 (s, 2H); 6,73 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz); 7,58 (bs, 1H); 8,22 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz); **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 28,3 (3C); 28,4; 64,0; 83,0; 106,4; 110,7; 151,8; 153,2; 159,2; 167,5.

25 **Exemple 1.7:** 2-(méthylamino)-4-((2-phénoxyacétoxy)méthyl)nicotinate de tert-butyl (**7**)

34



$$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$$

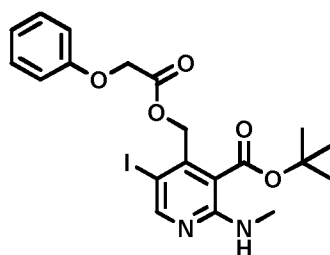
$$M = 372,41 \text{ g/mole}$$

Dans un ballon de 50 mL, 204 μL de chlorure de phénoxyacétyle (1,47 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 5 mL de DCM. 198 mg d'HOBt (1,47 mmoles, 1 éq) sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 10 min, 350 mg de **6** (1,47 mmol, 1 éq) sont ajoutés et la réaction est ensuite agitée à température ambiante pendant 24h. 40 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (4x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/AcOEt 8/2).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 70% (385 mg, 1,03 mmoles).

Pf = 149-151°C; **IR** (KBr): ν , 3365, 2970, 1760, 1668, 1583, 1192, 752; **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,59 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, ³J = 4,9 Hz); 4,75 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 6,53 (d, 1H, ³J = 5,1 Hz); 6,94 (m, 2H); 7,01 (t, 1H, ³J = 7,3 Hz); 7,30 (m, 2H); 7,89 (d, 1H, ³J = 4,2 Hz); 8,18 (d, 1H, ³J = 5,12 Hz); **RMN** ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,3 (4C); 65,2; 65,4; 83,1; 105,6; 108,9; 114,6 (2C); 121,8; 129,6 (2C); 147,4; 152,0; 157,6; 159,6; 167,1; 168,6.

Exemple 1.8: 5-iodo-2-(méthylamino)-4-((2-phénoxyacétoxy)méthyl)nicotinate de tert-butyle (**8**)



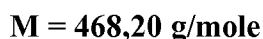
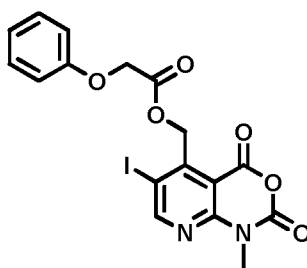
$$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{IN}_2\text{O}_5 \text{ (M} = 498,31 \text{ g/mole)}$$

Dans un ballon de 25 mL, sont introduits 280 mg de **7** (0,75 mmoles, 1 éq), 5 mL de DCM, 253 mg de NIS (1,12 mmoles, 1,5 éq) et 500 μ L d'acide acétique. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 3h à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé avec 20 mL d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium, repris dans 20 mL d'une solution saturée de NaHCO₃, puis extrait avec de l'Et₂O (4x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/AcOEt 9/1).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 91% (340 mg, 0,68 mmoles).

Pf = 127-129°C; **IR** (KBr) ν , 3424, 2934, 1755, 1704, 1576, 1193, 752; **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,56 (s, 9H); 2,97 (d, 3H, ³J = 4,6 Hz); 4,64 (s, 2H); 5,4 (s, 2H); 6,90 (d, 2H, ³J = 7,8 Hz); 6,99 (t, 1H, ³J = 7,3 Hz); 7,27 (m, 2H); 8,50 (s, 1H); le signal N-H est manquant; **RMN** ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,1 (3C); 28,4; 65,0; 68,7; 82,5; 83,7; 112,7; 114,6 (2C); 121,8; 129,5 (2C); 144,6; 157,5; 157,7; 158,3; 166,5; 168,3.

Exemple 1.9: (6-iodo-1-méthyl-2,4-dioxo-2,4-dihydro-1H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-5-yl)méthyl 2-phénoxyacétate (**9**)



Dans un ballon de 50 mL sous atmosphère d'azote, 300 mg de **8** (0,60 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 10 mL de DCM. 951 μ L de phosgène (20% dans le toluène, 1,80 mmoles, 3 éq) et 251 μ L de TEA (1,80 mmoles, 3 éq) sont ajoutés simultanément et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. Cette opération est répétée à trois reprises pour convertir la totalité de la matière première. 40 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (5x50 mL). Les phases organiques sont

alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H₂O/ACN 95/5 à H₂O/ACN 5/95). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 90% (255 mg; 0,54 mmoles).

- 5 **Pf** = 162-164°C; **IR** (KBr) ν (cm⁻¹) : 3439, 2935, 1787, 1757, 1728, 1450, 1176, 756; **RMN** ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,65 (s, 3H); 4,65 (s, 2H); 5,79 (s, 2H); 6,86 (d, 2H, ³J = 8,5 Hz); 6,96 (t, 1H, ³J = 7,5 Hz); 7,27 (m, 2H); 9,00 (s, 1H); **RMN** ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 31,2; 64,8; 66,7; 94,7; 107,7; 114,6 (2C); 121,8; 129,5 (2C); 146,8; 150,0; 153,3; 155,1; 157,5; 162,7; 168,2.

10 **Exemple 2 : Synthèse d'un type de molécule d'anhydride aza-isatoïque selon l'invention doté d'un groupement protecteur thermolabile O- Fluoro phenoxy acetate 13 (correspondant au composé V)**

On décrit ici la synthèse d'un autre exemple de composé selon l'invention (selon le schéma 4). Le composé précurseur 6 est fluoro-phénoxyacétylé (un groupement pouvant être plus thermolabile) pour donner le composé 11, puis iodé pour donner le composé 12 et enfin cyclisé afin d'obtenir le composé 13 aza-isatoïque.

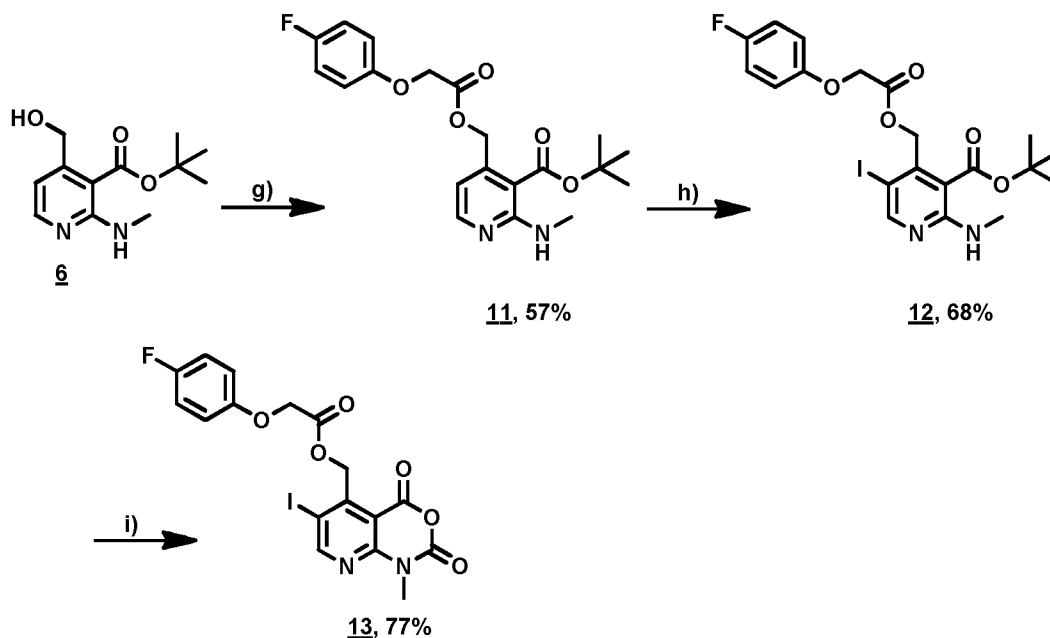
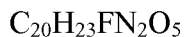
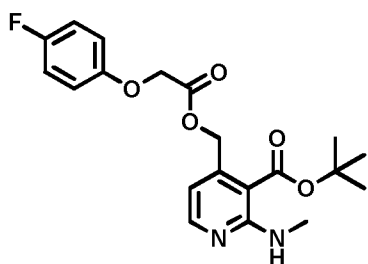


Schéma 4: Synthèse du composé 13 O-fluoro phénoxyacétylé. g) X=F, acide 4-fluorophénoxyacétique, EDC, HOBt, 5 min, ta puis 6, 3h, ta. h) NIS, DCM, AcOH, 2-3h, ta i) COCl₂, TEA, Et₂O, 30 min, ta.

Exemple 2.1: 4-((2-(4-fluorophénoxy)acétoxy)méthyl)-2-(méthylamino)nicotinate de tert-butyle (11)



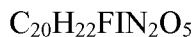
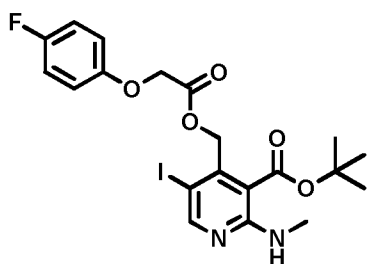
M = 390,40 g/mole

Dans un ballon de 50 mL, sont introduits 149 mg d'acide 4-fluorophénoxyacétique (0,88 mmol, 1,05 éq), 5 mL de DCM, 169 mg d'EDC (0,88 mmol, 1,05 éq) et 119 mg d'HOBt (0,88 mmol, 1,05 éq). Après 5 min à température ambiante, 200 mg de **6** (0,84 mmol, 1 éq) sont ajoutés et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 3h. 30 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (3x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP/AcOEt 9/1 à EP/AcOEt 8/2).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaunâtre avec un rendement de 57% (190 mg, 0.49 mmol).

Pf = 151-153°C; IR (KBr) ν, (cm⁻¹) : 3376, 2977, 2935, 1758 (CO), 1683 (CO), 1586, 1189, 831; RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,60 (s, 9H); 3,02 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,71 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 6,54 (d, 1H, 3J = 5,2 Hz); 6,88 (m, 2H); 6,99 (t, 2H, 3J = 8,3 Hz); 7,88 (s, 1H); 8,20 (d, 1H, 3J = 5,2 Hz); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,1; 28,3 (3C); 65,4; 65,9; 83,1; 105,6; 109,0; 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 116,0 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 147,3; 152,0; 153,8 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 159,5; 167,1; 168,4.

Exemple 2.2: (6-iodo-1-méthyl-2,4-dioxo-2,4-dihydro-1H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-5-yl)méthyl 2-(4-fluorophénoxy)acétate (**12**)

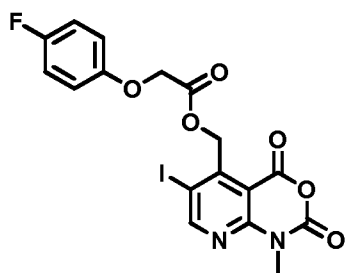


M = 516,30 g/mole

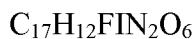
Dans un ballon de 25 mL, 200 mg de **11** (0,51 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 3
 5 mL de DCM. 172 mg de NIS (0,77 mmoles, 1,5 éq) et 150 μL d'acide acétique sont
 ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2h. Le mélange réactionnel
 est ensuite neutralisé avec 20 mL d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium,
 repris dans 20 mL d'une solution saturée de NaHCO_3 , puis extrait avec de l' Et_2O (4 \times 30
 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le
 10 brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient
 d'éluant (EP à EP/AcOEt 9/1). Le produit final est obtenu sous forme d'huile jaune avec
 un rendement de 68% (180 mg, 0,35 mmoles).

IR (KBr): ν , 3413, 2926, 1763, 1688, 1506, 1183, 828; RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ
 1,56 (s, 9H); 2,97 (d, 3H, 3J = 4,64 Hz); 4,60 (s, 2H); 5,37 (s, 2H); 6,85 (m, 2H); 6,96 (m,
 15 2H); 8,50 (s, 1H); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 28,1 (3C); 28,4; 65,7; 68,7; 82,4; 83,7;
 112,7; 115,9 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 116,0 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 144,5; 153,7; 157,7;
 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 158,3; 166,4; 168,2.

Exemple 2.3: (6-iodo-1-méthyl-2,4-dioxo-2,4-dihydro-1H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-5-yl)méthyl 2-(4-fluorophenoxy)acétate (**13**)



20



M = 486,19 g/mole

Dans un ballon de 50 mL sous atmosphère d'azote, 160 mg de **12** (0,31 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 3 mL de DCM. 489 μ L de phosgène (20% dans le THF, 0,98 mmoles, 9 éq) et 129 μ L de TEA (0,98 mmoles, 9 éq) sont ajoutés simultanément et la réaction est
5 laissée sous agitation pendant 30 min. 30 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (3x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H₂O/ACN 95/5 à H₂O/ACN 5/95).

- 10 Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 77% (115 mg; 0,24 mmoles).

Pf = 150-152°C; IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3454, 3078, 2934, 1787, 1745, 1504, 1194, 825;
RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,66 (s, 3H); 4,62 (s, 2H); 5,78 (s, 2H); 6,83 (m, 2H); 6,95 (m, 2H); 9,01 (s, 1H); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 31,2; 65,6; 66,8; 94,7; 107,7;
15 115,9 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 146,7; 150,0; 153,4; 153,7 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 155,2; 157,8 (d, 1JC-F = 239 Hz, 1C); 162,8; 168,1.

Exemple 3 : Synthèse d'un type de molécule d'anhydride aza-isatoïque selon l'invention doté d'un groupement protecteur acido/thermolabile N-Boc **18 (correspondant au composé VI)**

- 20 On décrit ici la synthèse d'un autre exemple de composé selon l'invention (selon le schéma 5). Le composé précurseur **6** est tout d'abord transformé en composé azido **15** précurseur d'une composé aminé sur laquelle fonction amine sera couplée le groupement protecteur BOC pour accéder au composé **16**. Une réaction d'iodation donne le composé **17** et enfin de cyclisation permet d'accéder au composé **18** aza-isatoïque.

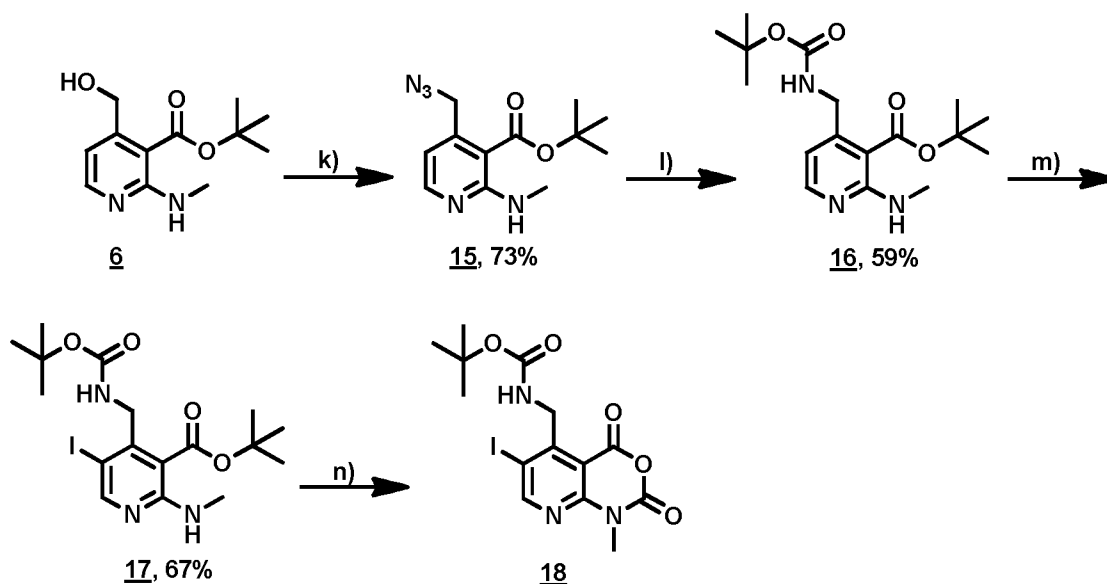
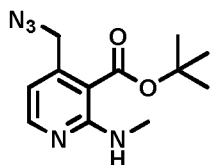


Schéma 5: Synthèse du composé N-boc **18**. k) MeSO_2Cl , NEt_3 , DCM, 3h, 0°C à ta puis NaN_3 , TEA, DCM, 3h, ta. l) Boc_2O , NaOH, PCy_3 , THF, 2h, ta. m) NIS, DCM, AcOH, 12h, ta. n) COCl_2 , TEA, Et_2O , 30 min, ta.

5 **Exemple 3:** 4-(azidométhyl)-2-(méthylamino)nicotinate de tert-butyle (**15**)



$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$

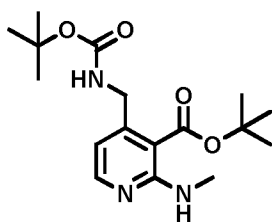
$M = 263,30$ g/mole

- Dans un ballon de 100 mL sous azote, 1,40 g de **6** (5,88 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 20 mL de DMF. A 0°C , 0,91 mL de MeSO_2Cl (11,76 mmoles, 2 éq) et 4,08 mL de TEA (29,3 mmol, 5 éq) sont ajoutés simultanément. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante et le suivi est réalisé par CCM (EP/ Et_2O 1/1). Après formation complète du dérivé mésylate correspondant, 1,15 g de NaN_3 (17,64 mmoles, 3 éq) sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation pendant 3h à température ambiante.
- 15 50 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l' Et_2O (3x60 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient

d'éluant (EP/ Et₂O 9/1 à EP/ Et₂O 8/2). Le produit final est obtenu sous forme d'huile jaune avec un rendement de 73% (1,13 g, 4,29 mmoles).

IR (KBr): ν , 3374, 2978, 2104 (N₃), 1679, 1586, 1425, 1125, 847, 655; RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, 3J = 5,0 Hz); 4,58 (s, 2H); 6,61 (d, 1H, 3J = 5,0 Hz); 7,73 (s, 1H); 8,24 (d, 1H, 3J = 5,0 Hz); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,3 (3C); 53,9; 77,0; 83,1; 106,7; 111,5; 146,8; 152,0; 159,5; 167,1.

Exemple 3.1 : 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-2-(méthylamino)nicotinate de tert-butyle (16)



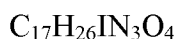
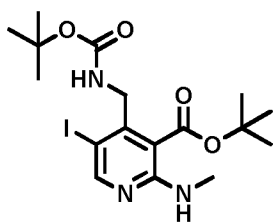
10 C₁₇H₂₇N₃O₄

M = 337,41 g/mole

Dans un ballon de 25 mL, 180 mg de **15** (0,68 mmoles, 1 éq) et 447 mg de Boc₂O (2,05 mmoles, 3 éq) sont mis en solution dans 5 mL de THF. 750 μ L d'une solution aqueuse de NaOH (0,75 mmoles, 1,1 éq, 1M dans H₂O) et 230 mg de PCy₃ sont ajoutés successivement. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2h. 30 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (3x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP/ AcOEt 9/1 à EP/ AcOEt 8/2). Le produit final est obtenu sous forme d'huile
 15
 20 jaune avec un rendement de 59% (135 mg, 0,40 mmoles).

RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,40 (d, 2H, 3J = 6,1 Hz); 5,02 (sl, 1H); 6,57 (d, 1H, 3J = 5,1 Hz); 7,52 (sl, 1H); 8,18 (d, 1H, 3J = 5,1 Hz); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,4 (6C); 28,5; 43,9; 79,6; 83,0; 107,6; 111,6; 150,5; 151,5; 155,7; 159,2; 167,4.

25 **Exemple 3.2** : 4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-5-iodo-2-(méthylamino)nicotinate de tert-butyl (17)



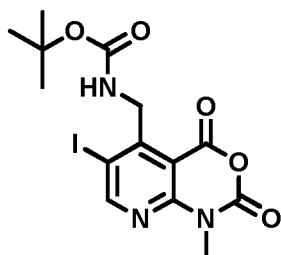
M = 463,31 g/mole

Dans un ballon de 25 mL, 130 mg de **16** (0,39 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 4 mL de DCM. 225 mg de NIS (0,58 mmoles, 1,5 éq) et 200 μ L d'acide acétique sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 12h. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé avec 10 mL d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium, repris dans 10 mL d'une solution saturée de NaHCO₃, puis extrait avec de l'Et₂O (4×30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/AcOEt 9/1).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 67% (121 mg, 0,26 mmoles).

RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H); 1,60 (s, 9H); 2,95 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 4,39 (d, 2H, 3J = 5,2 Hz); 4,82 (sl, 1H); 6,67 (sl, 1H); 8,48 (s, 1H); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,1 (3C); 28,3 (4C); 47,6; 79,5; 82,9; 83,9; 113,1; 147,7; 154,9; 157,5; 158,3; 166,7.

Exemple 3.4 : (6-iodo-1-méthyl-2,4-dioxo-2,4-dihydro-1H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-5-yl) méthyl carbamate de tert-butyle (**18**)



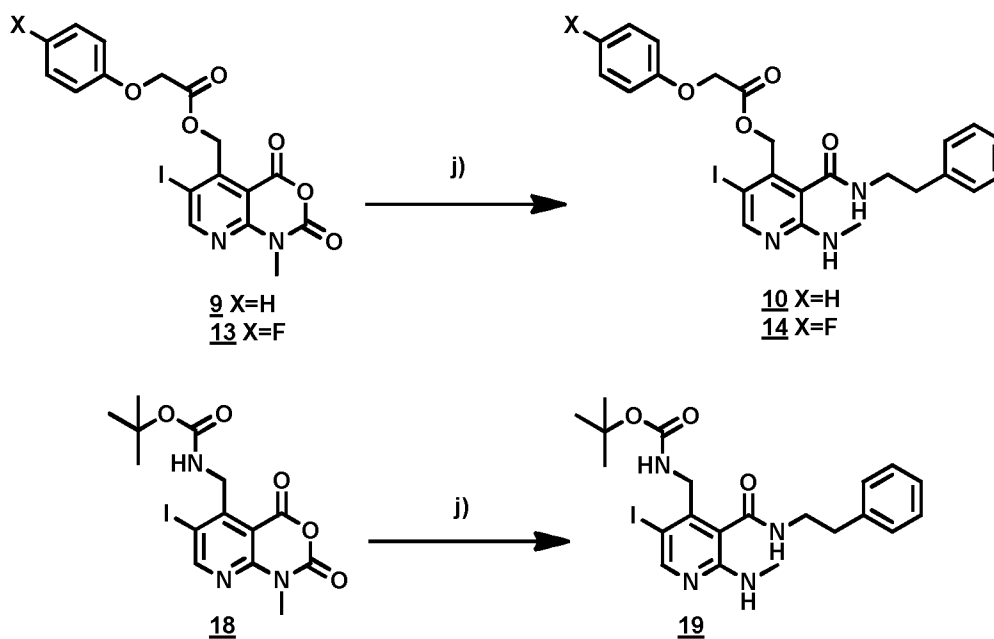
20

18

Dans un ballon de 25 mL sous atmosphère d'azote, 100 mg de **17** (0,22 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 3 mL de DCM. 342 μ L de phosgène (0,65 mmoles, 20% dans le toluène, 3 éq) et 90 μ L de TEA (0,65 mmoles, 3 éq) sont ajoutés simultanément et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Cette opération est répétée à trois reprises pour convertir la totalité de la matière première. 30 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec du DCM (3x30 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. L'anhydride azaisatoïque **18** ainsi obtenu a été directement mis en réaction sans étape de purification supplémentaire.

10 **Exemple 4:** Réaction des molécules dérivées de l'anhydride aza-isatoïque selon l'invention avec un composé aminé

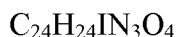
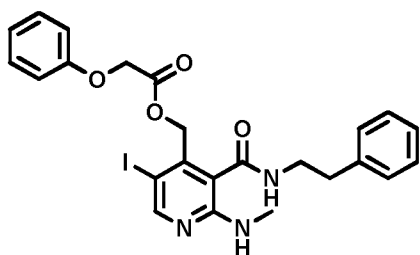
Cet exemple démontre que les molécules synthétisées dans les exemples 1 à 3, soit respectivement les molécules **9**, **13**, et **18** réagissent avec un composé aminé tel que la phényl éthyl amine.



15

Schéma 6: Ouverture des anhydrides azaisatoïques **9**, **13**, et **18** selon l'invention par la phényléthylamine. j) phényléthylamine, DCM, 1h, ta.

Exemple 4.1 : (5-iodo-2-(méthylamino)-3-(phénylcarbamoyl)pyridine-4-yl)méthyl 2-phénoxyacétate (**10**)



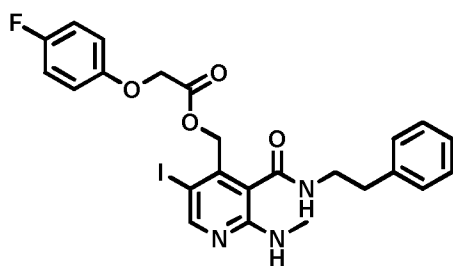
M = 545,37 g/mole

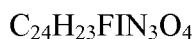
Dans un ballon de 10 mL, sont introduits 65 mg de **9** (0,13 mmoles, 1 éq), 1 mL de DCM
 5 et 17,4 μL de phényléthylamine (0,13 mmoles, 1 éq). Le mélange réactionnel est laissé
 sous agitation pendant 1h à température ambiante. 15 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la
 solution est extraite avec de l' Et_2O (5x20 mL). Les phases organiques sont alors
 rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur
 10 7/3).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaunâtre avec un rendement de 71% (50
 mg, 0,09 mmoles).

Pf = 164-166°C; IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3428, 3296, 2924, 1761, 1627, 1433, 1170, 754;
 RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,86 (s, 3H); 2,88 (d, 2H, 3J = 7,1 Hz); 3,69 (m, 2H); 4,57
 15 (s, 2H); 4,98 (s, 2H); 5,58 (d, 1H, 3J = 4,5 Hz); 6,54 (t, 1H, 3J = 5,6 Hz); 6,88 (d, 2H, 3J =
 8,8 Hz); 7,00 (t, 1H, 3J = 7,6 Hz); 7,21 (m, 2H); 7,28 (m, 5H); 8,40 (s, 1H); RMN 13C
 (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,4; 35,2; 40,6; 64,9; 67,3; 80,3; 114,6 (2C); 118,6; 122,0; 126,8;
 128,6 (2C); 128,7 (2C); 129,7 (2C); 138,1; 140,7; 156,3; 156,8; 157,5; 166,5; 168,3.

Exemple 4.2 : (5-iodo-2-(méthylamino)-3-(phényléthylcarbamoyl)pyridine-4-yl)méthyl 2-
 20 (4-fluorophénoxy)acétate (**14**)



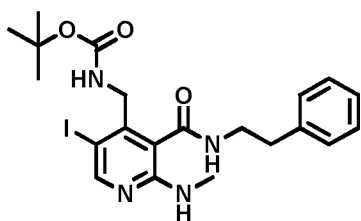


M = 563,36 g/mole

Dans un ballon de 10 mL, sont introduits 50 mg de **13** (0,10 mmoles, 1 éq), 1 mL de DCM et 12,9 μL de phényléthylamine (0,10 mmoles, 1 éq). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 1h. 10 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (5x15 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP/AcOEt 7/3 à EP/AcOEt 6/4). Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaunâtre avec un rendement de 87% (50 mg, 0,09 mmoles).

10 Pf = 165-167°C; IR (KBr): ν , 3388, 3376, 2924, 1742, 1661, 1577, 1504, 1191, 824; RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,86 (d, 3H, 3J = 4,64 Hz); 2,89 (t, 2H, 3J = 6,84 Hz); 3,72 (m, 2H); 4,51 (s, 2H); 4,99 (s, 2H); 5,55 (d, 1H, 3J = 4,6 Hz); 6,51 (t, 1H, 3J = 8,0 Hz); 6,83 (m, 2H); 6,97 (m, 2H); 7,21 (m, 3H); 7,30 (m, 2H); 8,40 (s, 1H); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,4; 35,1; 40,5; 65,6; 67,3; 80,2; 115,9 (d, 3JC-F = 8 Hz, 2C); 116,1 (d, 2JC-F = 23 Hz, 2C); 118,6; 126,8; 128,6 (2C); 128,7 (2C); 138,1; 140,7; 153,6 (d, 4JC-F = 2 Hz, 1C); 156,3; 156,8; 157,9 (d, 1JC-F = 222 Hz, 1C); 166,5; 168,1.

Exemple 4.3: ((5-iodo-2-(méthylamino)-3-(phénéthylcarbamoyl)pyridine-4-yl)méthyl)carbamate de tert-butyle (19)



20 $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{IN}_4\text{O}_3$

M = 510,37 g/mole

Dans un ballon de 10 mL, l'anhydride azaisatoïque **18** est mis en solution dans 1 mL de DCM. 27,6 μL de phényléthylamine (0,22 mmoles, 1 éq) sont alors ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h. 10 mL d'eau sont ensuite ajoutés et la solution est extraite avec de l'Et₂O (4x20 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Le brut réactionnel est ensuite

purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP/AcOEt 7/3 à EP/AcOEt 4/6).

Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaunâtre avec un rendement de 54% (61 mg, 0,12 mmoles).

- 5 RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,34 (s, 9H); 2,79 (d, 3H, 3J = 4,6 Hz); 2,88 (t, 2H, 3J = 7,1 Hz); 3,67 (m, 2H); 3,87 (d, 2H, 3J = 6,5 Hz); 5,47 (sl, 1H); 5,72 (sl, 1H); 7,18 (m, 5H); 8,27 (s, 1H); 8,98 (sl, 1H); RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28,3 (3C); 28,4; 30,0; 40,6; 44,9; 80,0; 80,6; 118,9; 126,4; 128,4 (2C); 128,7 (2C); 138,8, 143,1; 156,1; 156,2; 156,7; 166,7.

- 10 **Exemple 5:** Procédé de déprotection des composés aza-anthranylates et libération de la phényléthyl amine en conditions de PCR « hot-start »

Nous démontrons ici que les dérivés **10**, **14**, et **19** synthétisés à l'exemple 3 peuvent se cliver dans des conditions de PCR « hot-start » et libérer la phényléthyl amine qui mime une protéine.

- 15 **Procédure générale:**

Dans un tube de 1,5 mL, sont introduits : 20 μ L d'une solution d'amide (**10**, **14** ou **19**) à 2,5 mM dans le DMSO et 180 μ L d'un tampon utilisé de façon classique dans une réaction d'amplification de matériel génétique (60 mM Tris pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM) . Le mélange est alors laissé sous agitation à 95°C dans un thermomixer. Des suivis LCMS (condition 1) ont été réalisés à t = 15 min, 30 min et 1h.

Exemple 5.1: Evaluation du clivage à 95°C du dérivé aza-anthranylate phénoxyacétate **10**

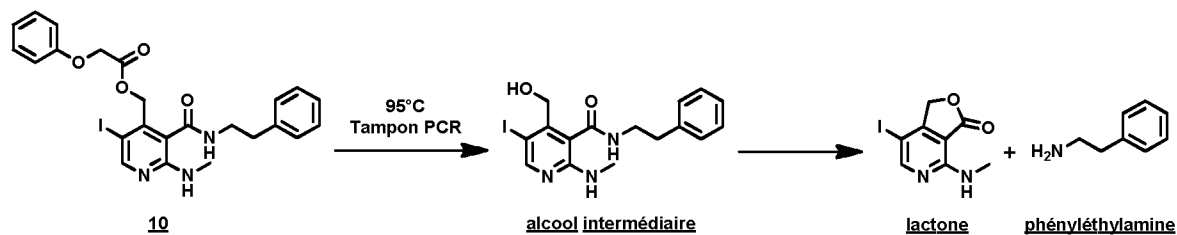


Schéma 7: Clivage du composé aza-anthranylate **10** dans des conditions de PCR « Hot-start »

La déprotection thermique du groupement phénoxyacétate conduit à la formation de l'alcool benzylique correspondant (cf Schéma 7). L'attaque nucléophile de l'alcool sur le carbonyle mis en jeu dans la liaison amide permet alors de relarguer la phényléthylamine dans le milieu en générant la lactone correspondante.

5 Cette cascade réactionnelle est représentée sur les chromatogrammes HPLC de la Figure 1.

Après 15 minutes à 95°C, on remarque la formation de l'alcool déprotégé et de la lactone attendue ce qui indique la libération de phényléthylamine. Ce résultat montre bien le caractère thermolabile du groupement phénoxyacétate conduisant à la formation de l'alcool correspondant. Après cyclisation, on retrouve la présence de la lactone attendue 10 témoignant du clivage de la liaison amide et donc du relargage de la phényléthylamine dans le milieu. Après 1h à 95°C, la population d'amide de départ et d'alcool ont quasiment totalement disparu au profit de la lactone.

Ce résultat démontre la possibilité de cliver une liaison amide à 95°C par ce système de cyclisation intramoléculaire.

15 **Exemple 5.2:** Evaluation du clivage à 95°C du dérivé aza-anthranylate fluoro phénoxyacétate **14**

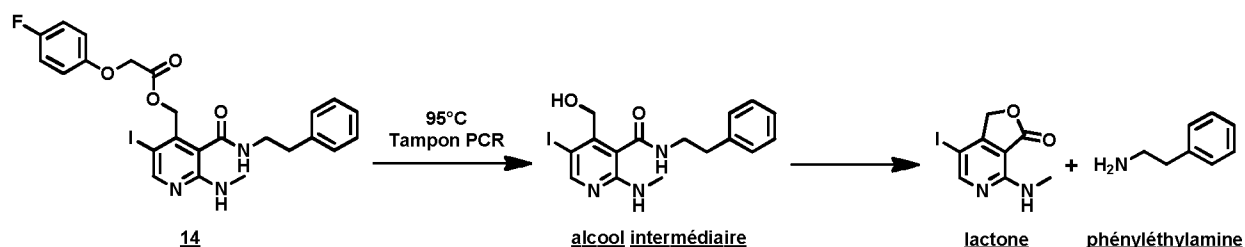


Schéma 8: Clivage du composé aza-anthranylate **14** dans des conditions de PCR «Hot-start» 20

Le procédé de déprotection a également été mis en œuvre à partir du dérivé fluorophénoxyacétate **14**. Après 15 minutes à 95°C, la population d'amide est très faible. En particulier, elle est plus faible par comparaison au résultat observé avec le dérivé **10** (voir Figure 2). La présence de l'atome de fluor accélère le clivage du groupement

phénoxyacétate. Ainsi, après 30 minutes, cette population d'amide a quasiment totalement disparu au profit de l'alcool et de la lactone très majoritaire indiquant la libération de phényléthylamine.

Exemple 5.3 : Evaluation du clivage à 95°C du dérivé aza-anthranylate N-Boc **19**

5

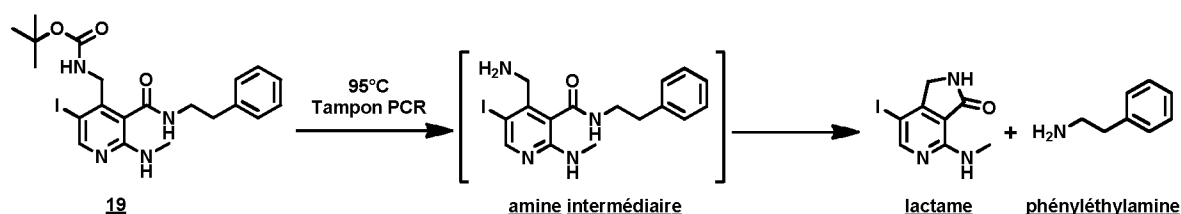


Schéma 9: Clivage des composés aza-anthranylate N-Boc **19** dans des conditions de PCR « Hot-start »

Dans ce cas, la déprotection du groupement N-boc conduit au dérivé amine benzylique intermédiaire.

10

Ce dernier peut alors cycliser pour former le lactame correspondant en libérant la phényléthylamine dans le milieu (Schéma 9 ci-dessus). Le suivi par HPLC montrant les différents composés intermédiaires est représenté sur la Figure 3.

Pour ce dérivé, la forme déprotégée non cyclisée (amine intermédiaire) n'est pas détectée.

15 Cet exemple démontre donc la cyclisation immédiate après déprotection du groupement N-boc pour former la phényléthylamine. Ceci confirme l'avantage de la fonction amino en position 5 par rapport à la fonction alcool, pour la vitesse de cyclisation. L'homme du métier saura donc trouver le groupement protecteur approprié de la fonction NH₂ en position 5 du cycle aromatique pour obtenir une déprotection suffisamment rapide

20 conduisant à une cyclisation instantanée, et à la libération de la phényléthylamine.

Exemple 6: Protection réversible de l'hémoglobine par le composé aza-isatoïque **13** tel que décrit dans l'invention

Nous démontrons ici que le dérivé aza-isotoïque **13** doté du groupement thermolabile fluoro-phenoxy est capable de réagir avec une protéine dans des conditions douces et en milieu aqueux pour former un dérivé protéine-aza anthranilate fluoro-phenoxy.

L'élimination de ce groupement protecteur suite à un traitement thermique à 95°C permet de régénérer la protéine native.

Protocole:

On réalise les mélanges tels que décrits ci-dessous où les expériences AL600 1x à AL 600 0.25X correspondent respectivement à 33µg d'hémoglobine mis en réaction avec des concentrations croissantes du composé aza-isotoïque dans un mélange de DMSO et de PBS à pH 7.4 (PBS = Phosphate buffered Saline issu de la dissolution d'une pastille de la référence Sigma P4417 dans 200 ml d'eau (pH 7,4)). Les mélanges sont mis à incuber à température ambiante pendant 2 heures avant de prélever un aliquot pour analyse par HPLC sur une colonne Waters (Milford, USA) XBridge BEH 300 C4 avec un gradient de 20 à 72% d'acétonitrile dans une solution d'acide trifluoroacétique à 10 mM en 120 min.

	Hémoglobine Humaine (Sigma H7379) 6.6µg/µl dans le PBS	PBS pH 7,4	DMSO	13 (41 mM dans le DMSO)
EXPERIENCES	µl	µl	µl	µl
AL 600 0.25x	5	5	8,75	1,25
AL 600 0.5x	5	5	7,5	2,5
AL 600 1x	5	5	5	5
CTRLS SANS Réactif acylant				
AL 602 CTRL 0.25X	5	5	10	0

Tableau 1: Concentration relative en réactifs pour réaliser l'acylation réversible de l'hémoglobine

Sur la Figure 4, le chromatogramme AL602 CTRL 0.25X montre l'hémoglobine de contrôle n'ayant pas réagi avec le composé **13**. On y visualise l'hème et les 2 sous unités alpha et beta de la partie protéique. Les 3 chromatogrammes suivants (AL 600 0.25 X-1X)

montrent la disparition de la partie protéique au profit d'un massif décalé vers la droite correspondant aux sous unités alpha et bêta acylé par le composé aza-isatoïque **13**. L'élargissement du pic correspond à l'acylation aléatoire des sites réactifs de la protéine.

On démontre ainsi que le composé aza-isatoïque tel que décrit selon l'invention peut réagir
5 avec une protéine.

Lorsque le milieu réactionnel AL 600 1X est soumis à un traitement thermique à 95°C pendant 15 min dans un tampon de PCR (constitué pour partie principale de Tris pH9), on observe une hydrolyse de la partie benzylamide qui conduit à restaurer le profil chromatographique de l'hémoglobine native. Ceci est visible sur la Figure 5 où le
10 chromatogramme du haut (A) représente l'hémoglobine native et reprise dans du GuHCl 8M, le chromatogramme du milieu (B) représente l'hémoglobine acylée par le composé **13** et reprise dans du GuHCl 8M et, où le chromatogramme du bas (C) représente l'hémoglobine acylée par le composé **13** puis chauffée dans du tampon Tris pH8 et reprise dans du GuHCl 8M. On voit distinctement comme précédemment que l'acylation de
15 l'hémoglobine conduit à la formation d'un massif de protéine acylé puis que ce massif disparaît suite à un traitement thermique pour régénérer la protéine native.

A noter que les milieux réactionnels ont été repris après réaction dans du GuHCl 8M afin de solubiliser la partie protéique qui aurait précipité lors du traitement thermique. Cet exemple démontre l'acylation réversible d'une protéine modèle par le composé **13** tel que
20 décrit dans l'invention.

Exemple 7: Démonstration de l'acylation réversible de la TAQ polymérase par le composé aza-isatoïque **13** tel que décrit dans l'invention

Nous démontrons ici que le dérivé aza-isatoïque **13** doté du groupement thermolabile fluoro-phénoxy est capable de réagir avec une polymérase thermostable (*Taq*) dans des
25 conditions douces et en milieu aqueux pour former un dérivé *Taq-aza* anthranilate fluorophénoxy. L'élimination de ce groupement protecteur suite à un traitement thermique à 95°C dans des conditions de PCR permet de restaurer l'activité de la polymérase, ce qui est démontré par le dosage de son activité.

Le concept d'utiliser des anhydrides aza-isatoïque convenablement modifiés pour masquer transitoirement l'activité d'une polymérase et la restaurer ensuite après un traitement thermique est ainsi démontré.

Protocole :

- 5 Nous avons utilisé la *Taq* Genscript (2500 u /100µl REF E00012), mais afin d'éliminer toutes traces de nucléophiles dans cette enzyme nous avons effectué préalablement un changement de tampon par passage sur un microcon 10 KD Amicon (n° 42407). La suspension enzymatique est ainsi déposée sur le microcon et centrifugée jusqu'à épuisement du tampon. Cinq lavages sont effectués avec 100 µl de PBS pH 7,4, puis le
- 10 dernier retentât est récupéré par inversion du tube et complété à QSP 20µl avec du PBS pour obtenir une suspension à 125 u/µl. Nous avons ainsi démontré que le Tris et le glycérol était éliminé de façon très satisfaisante par cette méthode.

- On réalise ensuite les mélanges tels que décrit dans le Tableau 2 où les expériences AL604 0.25x à AL 604 0.375X correspondent respectivement à 625 unités de *Taq* polymérase mis
- 15 en réaction avec des concentrations croissantes du composé aza-isatoïque dans un mélange de DMSO et de PBS à pH 7.4 (PBS = Phosphate buffered Saline issu de la dissolution d'une pastille de la référence Sigma P4417 dans 200 ml d'eau (pH 7,4)). Les mélanges sont mis à incuber à température ambiante pendant 3 heures sous vortex léger avant d'évaluer leur activité enzymatique dans des conditions de PCR « hot-start ».

	<i>Taq</i> Genscript (125 u/µl)	PBS pH 7,4	DMSO	13 (41 mM dans le DMSO)	Concentration en TAQ] finale (20 µl à 50/50 PBS/DMSO)
EXPERIENCES	Unités/µl	µl	µl	µl	u/µl
AL 604 0.25x	625 u/5 µl	5	8,75	1,25	31
AL 604 0,375x	625 u/5 µl	5	8,1	1,9	31

- 20 **Tableau 2:** Concentration relative en réactifs pour réaliser l'acylation réversible de la TAQ polymérase

Dosage de l'activité polymérase de la TAQ modifiée par le composé 13:

L'activité de polymérisation de la TAQ polymérase est réalisée à l'aide d'une sonde oligonucléotidique de 45 bases terminée par une structure en « épingle à cheveux ». Celle-ci est caractérisée par la présence d'un quencher de fluorescence en début de structure et par un fluorophore en fin de séquence de la sonde, de telle manière à ce que le quencher se retrouve spatialement proche du fluorophore et qu'aucun signal de fluorescence ne puisse être mesuré dans cette configuration. Sous l'action de l'activité polymérase, cette sonde est élonguée à l'aide d'un oligonucléotide de 19 bases complémentaire au début de la sonde précédente. Sous l'action de l'élongation, la structure en épingle à cheveux de la sonde se déplie et le fluorophore peut émettre et une fluorescence est alors mesurable. Cette mesure de fluorescence est effectuée à une température de 60°C pendant 20 minutes en présence des réactifs nécessaires à l'activité de l'enzyme, c'est-à-dire des dNTP, du MgCl₂ et un tampon basique à pH 9.5.

L'augmentation de la fluorescence est linéaire en début de mesure et permet de calculer une vitesse initiale correspondant à la quantité de fluorescence émise par minutes d'élongation. En mesurant cette vitesse initiale pour différentes concentrations d'une polymérase donnée ayant une activité connue en U/μL, il est possible d'établir une droite étalon permettant de mesurer l'activité d'une enzyme similaire et d'activité inconnue.

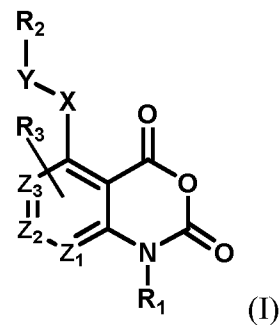
La modification chimique de la polymérase afin de la rendre inactive est mesurée par cette méthode. En mesurant le niveau d'activité résiduelle après modification de l'enzyme, il est possible de déterminer l'efficacité de la protection mise en place. Une polymérase totalement inactivée par modification chimique ne doit plus générer d'activité sans activation thermique à des températures supérieures à 90°C.

La capacité à restaurer l'activité de l'enzyme après chauffage de 15 min à 95°C par exemple est facilement mesurable par la même méthode.

La Figure 6 démontre donc qu'en fonction de la concentration choisie en agent acylant, on peut inactiver totalement l'activité polymérase de la *Taq* et la restaurer suite à un traitement à 95°C pendant 15 min dans des conditions de « Hot-start » PCR (voir colonne correspondant à AL 604 0,375X).

REVENDEICATIONS

1. Composé de formule (I) suivante :



dans laquelle

- 5 X est une liaison covalente ou un alkyle en C₁ à C₄,

Y est un radical nucléophile, de préférence O, S, NR₄, O-NR₄, NH-O, ou NH-NR₄, et R₄ est H ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,

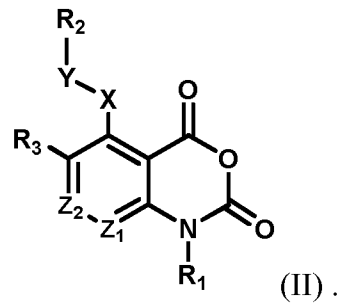
- 10 Z₁, Z₂, Z₃ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre, N ou C, de préférence Z₃ représente C, plus préférentiellement Z₃ est C et R₃ est en position Z₃,

R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle,

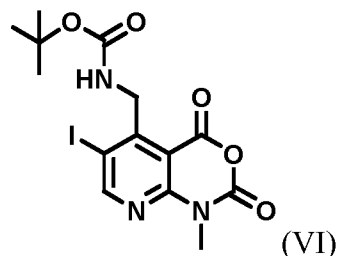
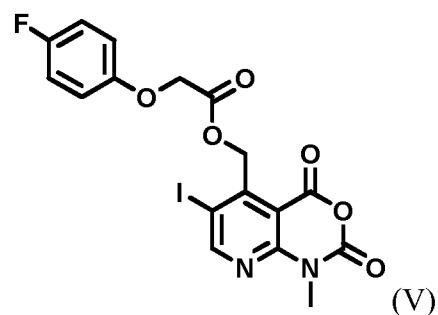
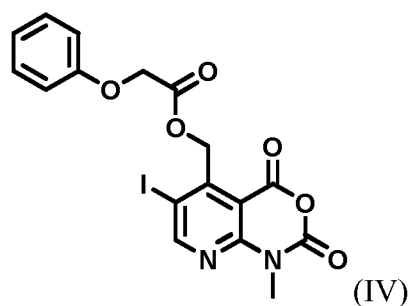
R₂ est un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

- 15 R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple un groupe iso-propyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl ou 2,2-diméthylpropyl, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène (e.g. F, Cl, Br et I), ou un groupe cyano.

2. Composé selon la revendication 1 de formule (II) suivante :



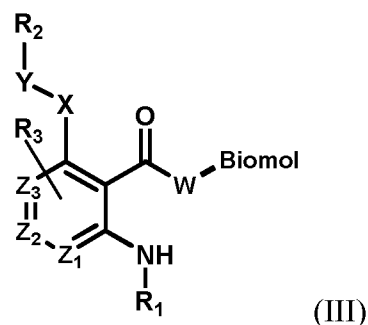
3. Composé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le
5
groupe ment thermolabile et/ou acidolabile R₂ est choisi parmi les groupements
tert-butoxycarbonyl (BOC), phénoxyacétyle substitué ou non, trityle,
méthoxytrityle, diméthoxytrityle ou citraconyle.
4. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en
10
ce que R₁ est un groupe méthyle.
5. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en
ce que R₃ est l'iode.
6. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en
15
ce que Z₁ est N et Z₂ est C.
7. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par
l'une des structures suivantes :



8. Procédé de préparation d'une molécule biologique protégée, comprenant la
5 mise en contact d'un composé selon l'une des revendications 1 à 7 avec une
molécule biologique comprenant un ou plusieurs groupes nucléophiles, dans
des conditions permettant l'acylation d'un ou plusieurs groupes nucléophiles de
ladite molécule biologique, pour former une molécule biologique protégée.

10 9. Molécule biologique protégée, susceptible d'être obtenue par le procédé de la
revendication 8.

10. Molécule biologique protégée, de formule (III) suivante :



15 dans laquelle

Biomol est une molécule biologique

W est un groupe nucléophile de la molécule biologique, par exemple NH, S ou
O,

X est une liaison covalente ou un alkyle en C₁ à C₄,

Y est un radical nucléophile, de préférence O, S, NR₄, O-NR₄, NH-O, ou NH-NR₄, et R₄ est H ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,

Z₁, Z₂, Z₃ représentent chacun indépendamment l'un de l'autre, N ou C, de préférence Z₃ représente C, plus préférentiellement Z₃ est C et R₃ est en position Z₃,

5

R₁ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₆, substitué ou non, un alcényle substitué ou non, un groupe aryle substitué ou non, ou un hétérocycle substitué ou non, de préférence R₁ est un groupe méthyle ou éthyle,

R₂ est H ou un groupement protecteur thermolabile et/ou acidolabile,

10

R₃ est H, un groupe alkyle en C₁ à C₁₂ substitué ou non, par exemple un groupe iso-propyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl ou 2,2-diméthylpropyl, un groupe aryle substitué ou non, un hétérocycle substitué ou non, un groupe acyle, un groupe alcényle substitué ou non, un halogène, ou un groupe cyano.

15

11. Molécule biologique protégée selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que Biomol est choisi parmi les enzymes.

20

12. Molécule biologique protégée selon la revendication 11 caractérisée en ce que Biomol est une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction de polymérisation d'acide nucléique, par exemple une ADN polymérase.

25

13. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 7 pour l'inactivation réversible d'une enzyme.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'enzyme est une enzyme destinée à être utilisée dans une réaction de polymérisation d'acide nucléique, par exemple une ADN polymérase.

30

15. Utilisation d'une molécule biologique protégée selon la revendication 12, dans une réaction d'amplification d'acide nucléique, par exemple pour des applications de démarrage à chaud « Hot Start ».

16. Procédé de déprotection des groupes nucléophiles d'une molécule biologique protégée selon l'une des revendications 9 à 12, ledit procédé comprenant une

étape de clivage du ou des groupements thermolabiles et/ou acidolabiles R₂, par traitement thermique et/ou acide respectivement, et la déprotection concomitante des groupes nucléophiles.

- 5 17. Procédé de polymérisation d'un acide nucléique comprenant (i) la mise en œuvre d'une molécule biologique protégée selon la revendication 12, (ii) au moins une étape pour la déprotection de ladite molécule biologique, par exemple par un traitement thermique à une température permettant le clivage du ou des groupements thermolabiles R₂, (iii) une étape de polymérisation d'acide nucléique à l'aide de la polymérase déprotégée à l'étape (ii).
- 10

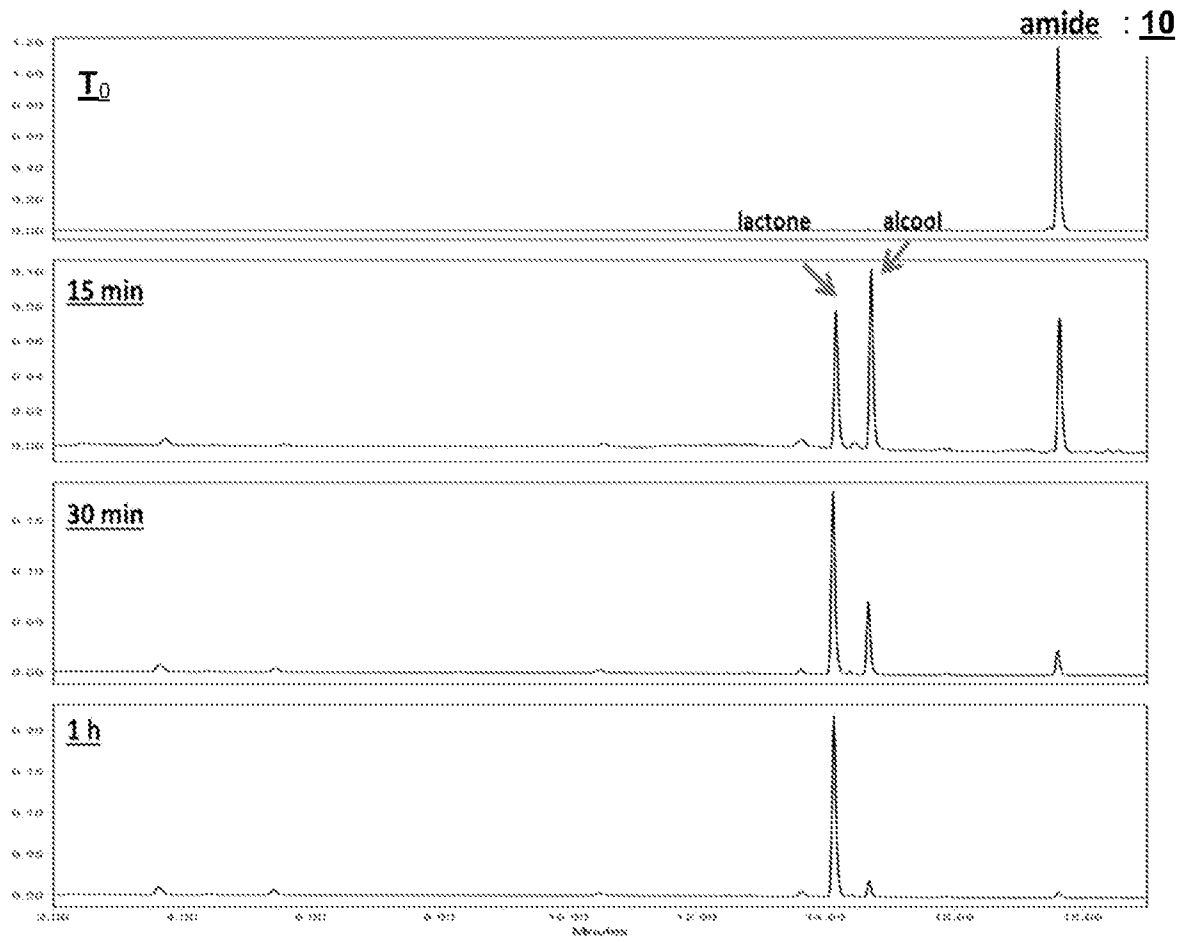


Figure 1

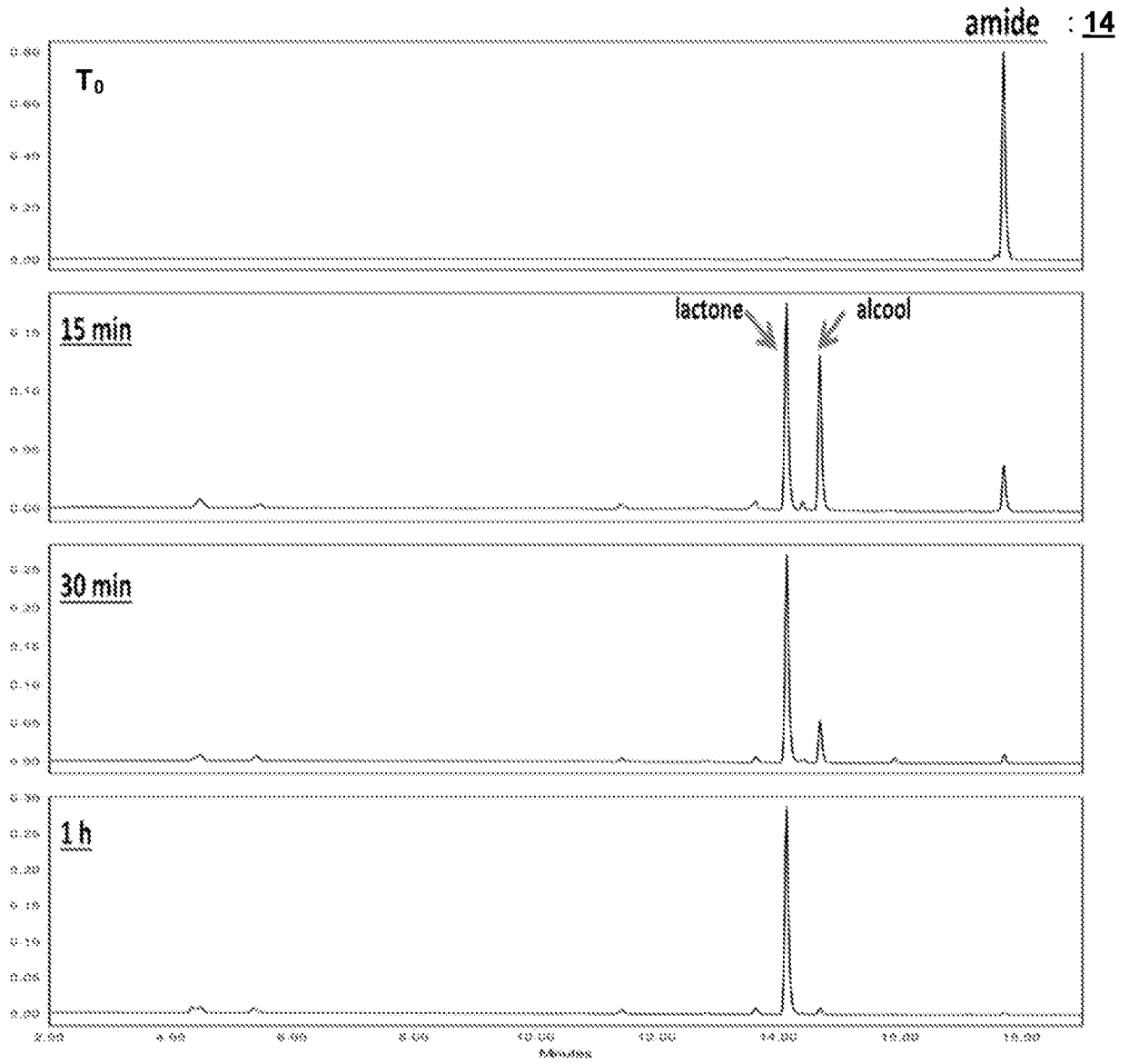


Figure 2

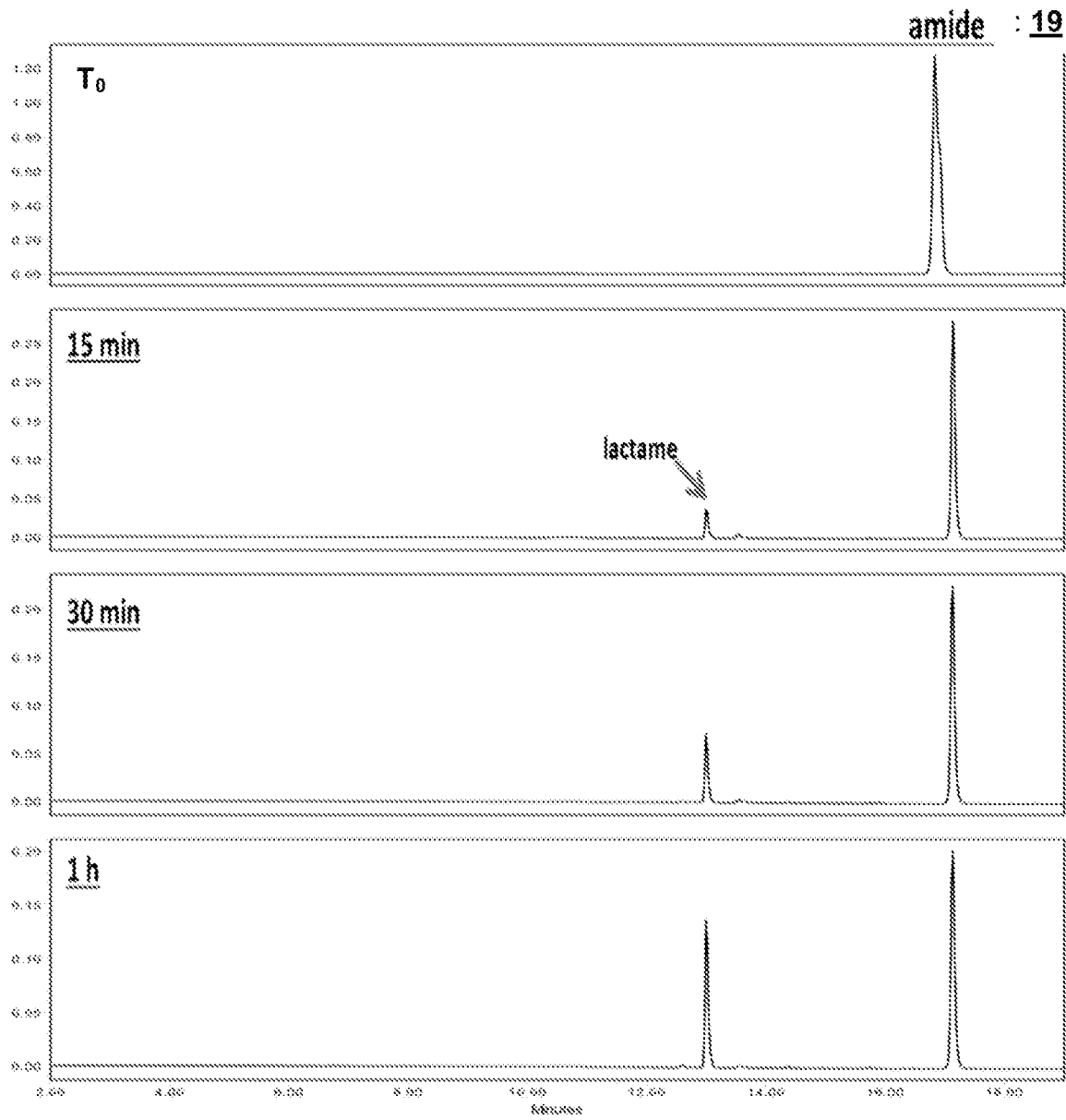


Figure 3

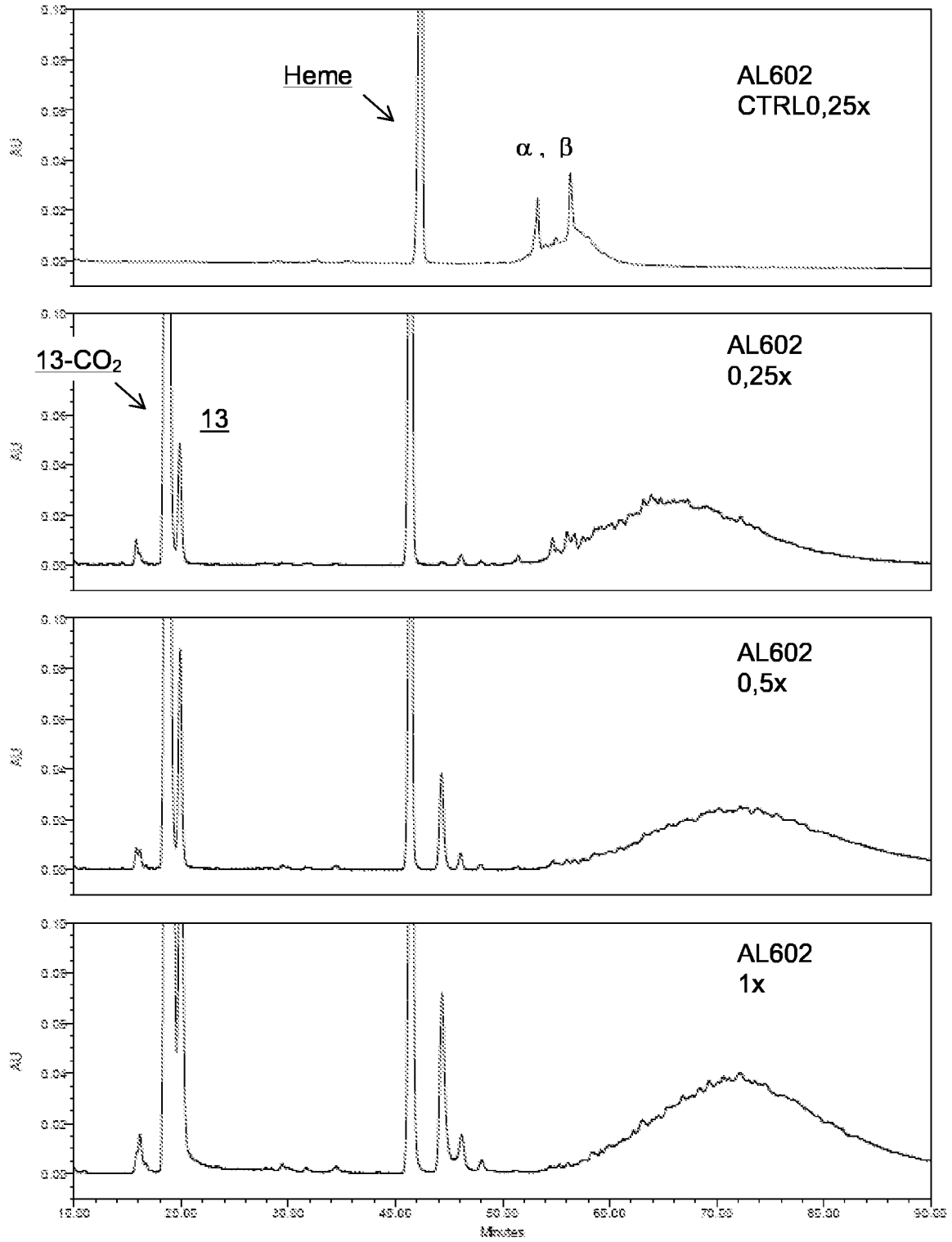


Figure 4

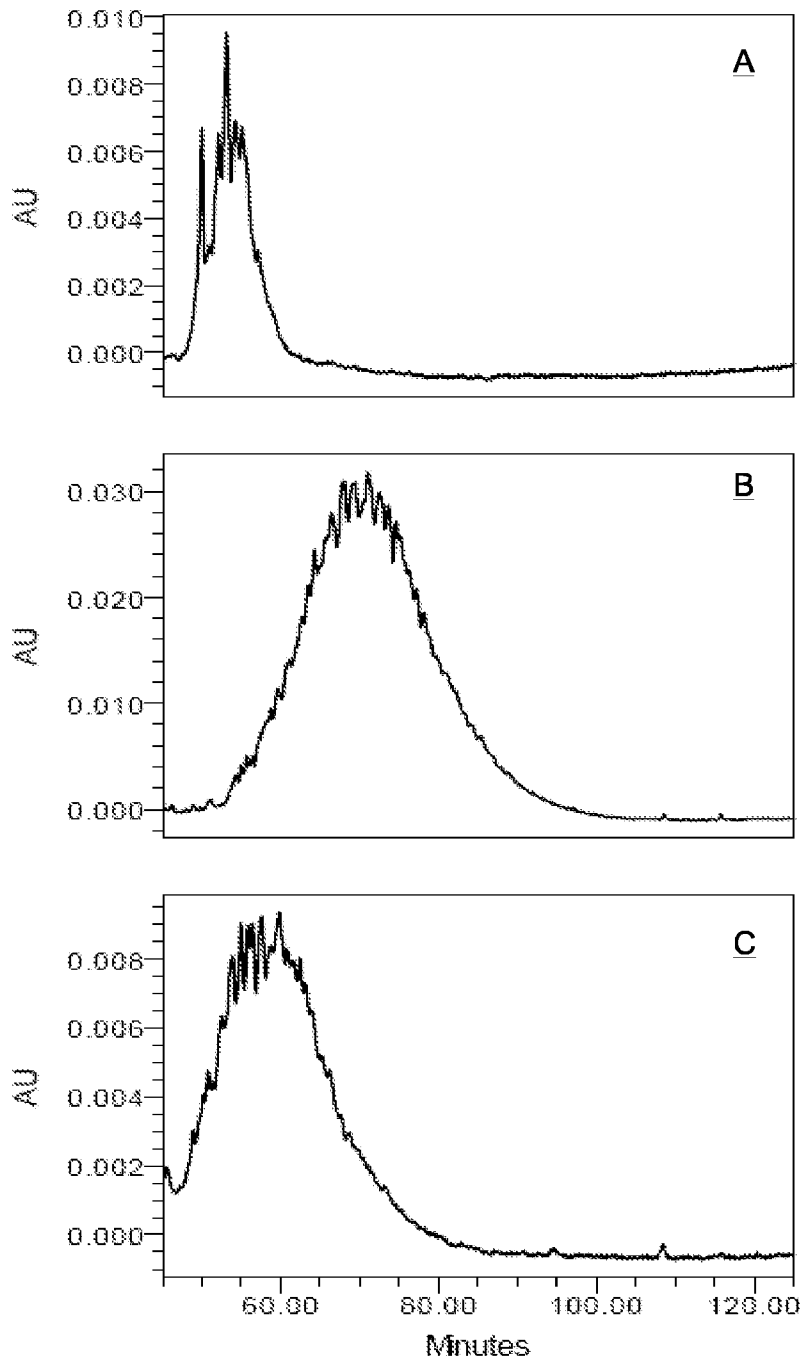


Figure 5

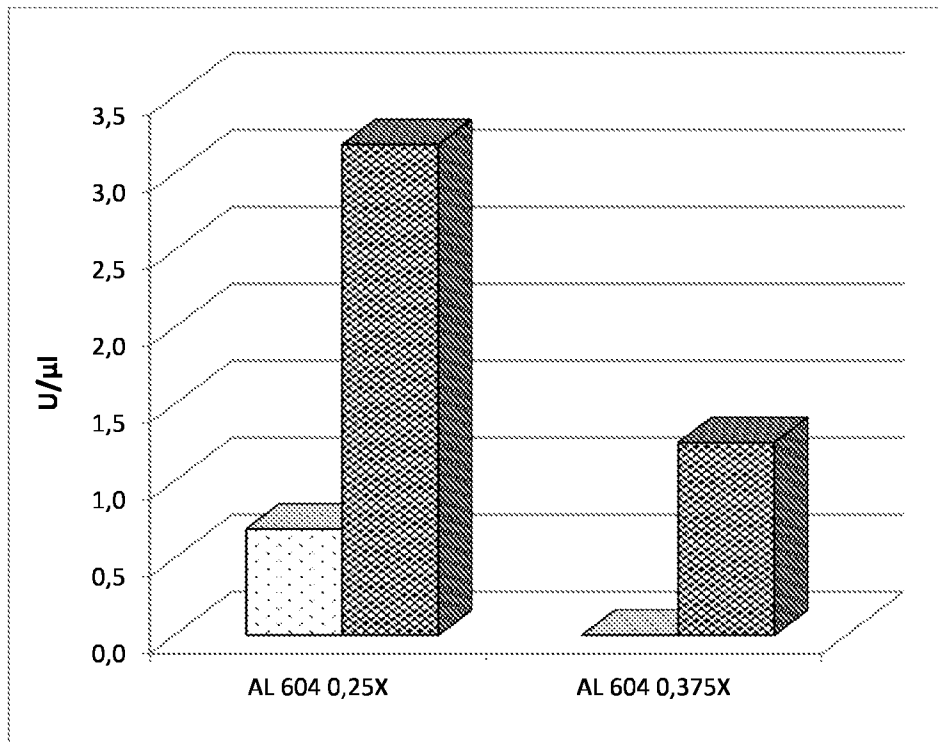


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/051925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D498/04 C12Q1/68 C12N9/99 C12N9/12
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D C12Q C12N
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 771 870 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 7 May 1997 (1997-05-07) the whole document	1-17
A	WO 2014/019966 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]) 6 February 2014 (2014-02-06) the whole document claim 11	1-17
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 6 September 2017	Date of mailing of the international search report 14/09/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ladenburger, Claude

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/051925

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ISIDOR MORRIS HEILBRON ET AL: "CCXCII.-Chemical reactivity and conjugation. Part II. The reactivity of the 2-methyl group in the 4-quinazolone series", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, TRANSACTIONS, vol. 127, 1925, pages 2167-2175, XP055327693, ISSN: 0368-1645, DOI: 10.1039/CT9252702167 page 2174, ligne 7, composé 5-Methoxymethylisatoic anhydride nommé 6-Methoxymethyl de façon erronée (voir composés 5-Methoxymethylanthranilic acid précédent et 5-Methoxymethylanthranilamide suivant)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>TATSUO NAGASAKA ET AL: "Stereoselective synthesis of tilivalline", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 63, no. 20, 1998, pages 6797-6801, XP002136000, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/J0972158G compound 12c</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>WO 2004/052312 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; CHAI DEPING [US]) 24 June 2004 (2004-06-24) examples 23a,b</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>WO 2008/149168 A1 (SANOFI AVENTIS [FR]; SUSAN EDIT [HU]) 11 December 2008 (2008-12-11) example 8d</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
A	<p>G. NORCINI ET AL: "Synthesis and pharmacological evaluation of tyramine congeners containing fused heterocyclic rings", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 28, 1993, pages 505-511, XP023870315, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/0223-5234(93)90018-A [retrieved on 1993-01-01] compound 35</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/051925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0771870	A1	07-05-1997	AT 176499 T
			AU 689047 B2
			BR 9603563 A
			CA 2184105 A1
			CN 1151437 A
			CZ 9602495 A3
			DE 771870 T1
			DE 69601488 D1
			DE 69601488 T2
			DK 0771870 T3
			EP 0771870 A1
			ES 2101668 T1
			HU 9602289 A2
			IL 119088 A
			JP 3026554 B2
			JP H09103292 A
			NO 963541 A
			PL 315803 A1
			RU 2174556 C2
			US 5677152 A
			US 5773258 A

WO 2014019966	A1	06-02-2014	EP 2880016 A1
			FR 2994184 A1
			JP 2015526076 A
			US 2015210732 A1
			WO 2014019966 A1

WO 2004052312	A2	24-06-2004	AU 2003300956 A1
			WO 2004052312 A2

WO 2008149168	A1	11-12-2008	AR 066873 A1
			AT 502016 T
			AU 2008259534 A1
			BR PI0812257 A2
			CA 2689612 A1
			CL 2008001648 A1
			CN 101679272 A
			CO 6270233 A2
			CR 11171 A
			CY 1111644 T1
			DK 2167470 T3
			DO P2009000276 A
			EC SP099783 A
			EP 2167470 A1
			ES 2363672 T3
			GT 200900301 A
			HK 1138581 A1
			HN 2009003357 A
			HR P20110332 T1
			JO 2689 B
			JP 5487100 B2
			JP 2010529100 A
			MA 31738 B1
			MY 148654 A
			NZ 581186 A
			PA 8782901 A1
			PE 03252009 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/051925

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PT 2167470 E	16-05-2011
		RU 2009149518 A	20-07-2011
		SI EP2167470 T1	30-06-2011
		SV 2009003420 A	26-04-2010
		TN 2009000482 A1	31-03-2011
		TW 200914451 A	01-04-2009
		UA 99463 C2	27-08-2012
		US 2010216786 A1	26-08-2010
		UY 31130 A1	30-01-2009
		WO 2008149168 A1	11-12-2008
		ZA 200908280 B	28-07-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/051925

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D498/04 C12Q1/68 C12N9/99 C12N9/12 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07D C12Q C12N				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
A	EP 0 771 870 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 7 mai 1997 (1997-05-07) le document en entier	1-17		
A	WO 2014/019966 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]) 6 février 2014 (2014-02-06) le document en entier revendication 11	1-17		
	----- -/--			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale			
6 septembre 2017	14/09/2017			
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé			
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Ladenburger, Claude			

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ISIDOR MORRIS HEILBRON ET AL: "CCXCII.-Chemical reactivity and conjugation. Part II. The reactivity of the 2-methyl group in the 4-quinazolone series", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, TRANSACTIONS, vol. 127, 1925, pages 2167-2175, XP055327693, ISSN: 0368-1645, DOI: 10.1039/CT9252702167 page 2174, ligne 7, composé 5-Methoxymethylisatoic anhydride nommé 6-Methoxymethyl de façon erronée (voir composés 5-Methoxymethylanthranilic acid précédent et 5-Methoxymethylanthranilamide suivant)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>TATSUO NAGASAKA ET AL: "Stereoselective synthesis of tilivalline", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 63, no. 20, 1998, pages 6797-6801, XP002136000, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/J0972158G composé 12c</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>WO 2004/052312 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; CHAI DEPING [US]) 24 juin 2004 (2004-06-24) exemples 23a,b</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
X	<p>WO 2008/149168 A1 (SANOFI AVENTIS [FR]; SUSAN EDIT [HU]) 11 décembre 2008 (2008-12-11) exemple 8d</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2
A	<p>G. NORCINI ET AL: "Synthesis and pharmacological evaluation of tyramine congeners containing fused heterocyclic rings", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 28, 1993, pages 505-511, XP023870315, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/0223-5234(93)90018-A [extrait le 1993-01-01] composé 35</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/051925

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0771870	A1	07-05-1997	AT 176499 T	15-02-1999
			AU 689047 B2	19-03-1998
			BR 9603563 A	19-05-1998
			CA 2184105 A1	26-02-1997
			CN 1151437 A	11-06-1997
			CZ 9602495 A3	11-06-1997
			DE 771870 T1	09-10-1997
			DE 69601488 D1	18-03-1999
			DE 69601488 T2	30-09-1999
			DK 0771870 T3	20-09-1999
			EP 0771870 A1	07-05-1997
			ES 2101668 T1	16-07-1997
			HU 9602289 A2	28-05-1997
			IL 119088 A	16-07-2000
			JP 3026554 B2	27-03-2000
			JP H09103292 A	22-04-1997
			NO 963541 A	26-02-1997
			PL 315803 A1	03-03-1997
			RU 2174556 C2	10-10-2001
			US 5677152 A	14-10-1997
			US 5773258 A	30-06-1998

WO 2014019966	A1	06-02-2014	EP 2880016 A1	10-06-2015
			FR 2994184 A1	07-02-2014
			JP 2015526076 A	10-09-2015
			US 2015210732 A1	30-07-2015
			WO 2014019966 A1	06-02-2014

WO 2004052312	A2	24-06-2004	AU 2003300956 A1	30-06-2004
			WO 2004052312 A2	24-06-2004

WO 2008149168	A1	11-12-2008	AR 066873 A1	16-09-2009
			AT 502016 T	15-04-2011
			AU 2008259534 A1	11-12-2008
			BR PI0812257 A2	23-12-2014
			CA 2689612 A1	11-12-2008
			CL 2008001648 A1	10-10-2008
			CN 101679272 A	24-03-2010
			CO 6270233 A2	20-04-2011
			CR 11171 A	21-04-2010
			CY 1111644 T1	07-10-2015
			DK 2167470 T3	27-06-2011
			DO P2009000276 A	31-01-2010
			EC SP099783 A	29-01-2010
			EP 2167470 A1	31-03-2010
			ES 2363672 T3	11-08-2011
			GT 200900301 A	22-04-2010
			HK 1138581 A1	24-06-2011
			HN 2009003357 A	12-08-2013
			HR P20110332 T1	30-06-2011
			JO 2689 B	03-03-2013
			JP 5487100 B2	07-05-2014
			JP 2010529100 A	26-08-2010
			MA 31738 B1	01-10-2010
			MY 148654 A	15-05-2013
			NZ 581186 A	30-03-2012
			PA 8782901 A1	23-01-2009
			PE 03252009 A1	17-04-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/051925

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		PT 2167470 E	16-05-2011
		RU 2009149518 A	20-07-2011
		SI EP2167470 T1	30-06-2011
		SV 2009003420 A	26-04-2010
		TN 2009000482 A1	31-03-2011
		TW 200914451 A	01-04-2009
		UA 99463 C2	27-08-2012
		US 2010216786 A1	26-08-2010
		UY 31130 A1	30-01-2009
		WO 2008149168 A1	11-12-2008
		ZA 200908280 B	28-07-2010
