

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
3 décembre 2009 (03.12.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale

WO 2009/144418 A1

(51) Classification internationale des brevets :  
*C07H 1/00* (2006.01)    *C07H 19/16* (2006.01)  
*C07H 19/06* (2006.01)    *C07H 21/02* (2006.01)

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **DEBART, Françoise** [FR/FR]; 5, allée du Plein Sud, F-34980 Combaillaux (FR). **VASSEUR, Jean-Jacques** [FR/FR]; 5, allée du Plein Sud, F-34980 Combaillaux (FR). **LAVERGNE, Thomas** [FR/FR]; 549, boulevard de la Lironde, F-34980 Saint Clement de Riviere (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/000624

(74) Mandataires : **NOËL, Chantal** et al.; Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
28 mai 2009 (28.05.2009)

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

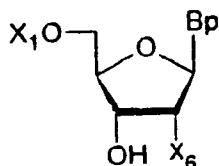
(30) Données relatives à la priorité :  
0802928                        29 mai 2008 (29.05.2008) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **UNIVERSITE MONTPELLIER 2** [FR/FR]; 2, place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 5 (FR).

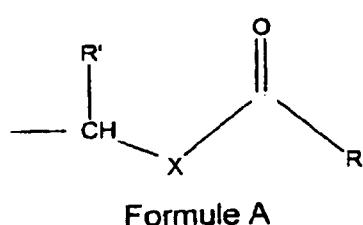
*[Suite sur la page suivante]*

(54) Title : CHEMICAL RNA SYNTHESIS METHOD

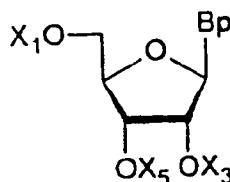
(54) Titre : PROCEDE DE SYNTHESE D'ARN PAR VOIE CHIMIQUE



Formule II



Formule A



Formule III

(57) Abstract : The invention relates to a method for the chemical synthesis of RNA, comprising the following steps: a) bonding to a solid support of a monomer having formula (II) in which -  $X_1$  is a dimethoxytrityl group, -  $X_6$  is H or an OAc group or  $OX_3$ , in which  $X_3$  is a group having formula (A), in which X is O or S,  $R'$  is H or  $CH_3$  and R is selected from a linear or branched alkyl group at  $C_1$  to  $C_4$  and a  $R_1-O-R_2$  group in which  $R_1$  is an alkyl group at  $C_1$  to  $C_2$  and  $R_2$  is a  $CH_3$  group or  $CH_2CH_2-O-CH_3$  or aryl; b) assembly with the monomer having formula (II) bound to the support thereof obtained in step (a) of at least one monomer having formula (III) in which  $X_1$ , Bp,  $X_3$  are as defined for formula (II) and  $X_5$  is a hydrogen phosphonate monoester or phosphoramidite group, preferably a 2-cyanoethyl-*N*, *N*-diisopropylphosphoramidite group, which is used to obtain a protected single-strand RNA bound to a support.

(57) Abrégé : L'invention propose un procédé de synthèse d'ARN par voie chimique comprenant les étapes de : a) liaison à un support solide d'un monomère de formule (II) suivant dans laquelle: -  $X_1$  est un groupe diméthoxytrityle, -  $X_6$  est H ou un groupe OAc ou  $OX_3$  dans lequel  $X_3$  est un groupe de formule (A) suivante : dans laquelle X est O ou S,  $R'$  est H ou  $CH_3$  et R est choisi parmi un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $R_1-O-R_2$  dans lequel  $R_1$  est un groupe en  $C_1$  à  $C_2$  et  $R_2$  est un groupe  $CH_3$  ou  $CH_2CH_2-O-CH_3$  ou aryle. b) assemblage, avec le monomère de formule (II) lié à son support obtenu à l'étape a), d'au moins un monomère de formule (III) suivante : dans laquelle

*[Suite sur la page suivante]*



SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

## PROCEDE DE SYNTHESE D'ARN PAR VOIE CHIMIQUE

L'invention concerne un procédé de synthèse d'ARN, un procédé de libération d'un ARN protégé ainsi qu'un procédé de synthèse de monomères ribonucléotidiques protégés.

5 Depuis la découverte de l'ARN interférence (ARNi), un besoin crucial de petits ARN synthétiques, en particulier de petits oligoribonucléotides de 21 nucléotides de long (siARN), est apparu pour la recherche biologique et les applications thérapeutiques.

10 Les unités ribonucléotidiques constituant ces ARN peuvent être des unités ribonucléotidiques naturelles ou modifiées, que ce soit par modification de la nucléobase ou du cycle ribose, comme cela est connu dans l'art, et en particulier comme décrit dans Watts, J. K. *et al.*, Drug Discovery Today, Vol. 13, 19/20, octobre 2008, Schram K. H. *et al.*, Mass Spectrometry Reviews, 1998, 17, 131-251, et Porcher *et al.*, Helvetica Chimica Acta., Vol. 88, 2005, pages 2683-15 2704.

20 En comparaison à la synthèse d'ADN, la production d'ARN synthétiques est plus complexe de par la présence de la fonction hydroxyle sur la position 2' du sucre ribose qu'il faut protéger. La recherche du groupe protecteur idéal est un point crucial de la réussite de la synthèse d'ARN. En plus des rendements de couplages plus faibles dans l'assemblage de la chaîne en 25 comparaison à la synthèse d'ADN, la difficulté principale de la chimie de l'ARN résulte de l'instabilité de l'ARN en milieu basique.

C'est pourquoi il est généralement admis dans l'art que la 25 stratégie de synthèse standard utilisée pour la production d'oligodésoxyribonucléotides (petits ADN) où toutes les fonctions réactives de l'ADN sont protégées avec des groupes protecteurs baso-labiles, c'est-à-dire enlevés à la fin du procédé d'elongation chimique par un seul traitement avec une base n'est pas applicable à la production d'oligoribonucléotides (petits ARN).

30 Comme pour la synthèse d'ADN, les deux voies les plus couramment utilisées à l'heure actuelle pour synthétiser des ARN par voie chimique sont, d'une part, la voie aux phosphoramidites, et, d'autre part, la voie aux hydrogénophosphonates (H-phosphonates).

Dans la voie aux phosphoramidites, on assemble des monomères fonctionnalisés en 3' par un groupe phosphoramidite, l'ARN assemblé ayant alors un lien phosphate internucléotidique 3'-5' protégé, de préférence par un groupe cyanoéthyle.

5 Le groupe triméthylsilyléthyle (TSE) peut également être utilisé comme groupe protecteur des phosphates, comme enseigné, par exemple dans Parey et al. "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA", Organic Letters, 2006, Vol.8, No.17, 3869-3872. Mais il est indiqué, dans ce document, que le groupe TSE a été choisi car, 10 contrairement au groupe cyanoéthyle, il n'est pas éliminé dans des conditions basiques mais par des ions fluorures. Il est également indiqué, dans ce document, qu'en réalité le groupe TSE a été éliminé par la solution d'iode utilisée pour l'oxydation effectuée pour obtenir les liens phosphodiesters 3'-5'.

15 Dans la voie aux hydrogénophosphonates, on assemble des monomères fonctionnalisés en 3' par un groupe hydrogénophosphonate monoester, l'ARN assemblé ayant alors un lien internucléotidique 3'-5' qui est un lien hydrogénophosphonate diester qui est ensuite oxydé en phosphate. Dans cette voie, l'ARN obtenu en fin d'elongation et après oxydation a des liens internucléosidiques 3'-5' phosphates non protégés.

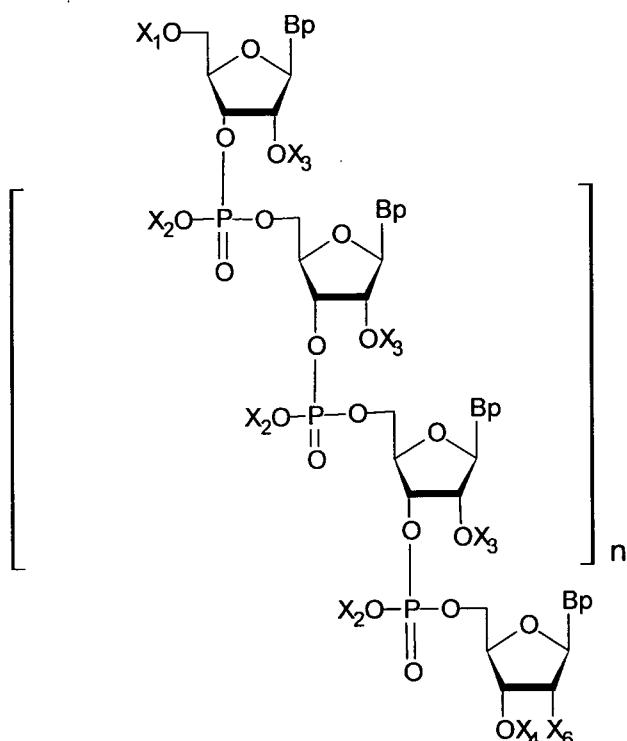
20 Dans la voie aux phosphoramidites, il est généralement admis dans l'art que la protection de l'hydroxyle en position 2' du sucre ribose ne doit pas être effectuée avec un groupe protecteur baso-labile qui serait enlevé en même temps que le groupe protecteur du phosphate, ce qui entraînerait l'attaque nucléophile par l'hydroxyle en position 2' de l'atome de phosphore dans les 25 liaisons internucléotidiques résultant en une isomérisation 2'-5' des liaisons naturelles 3'-5' ou en une rupture de la liaison 3'-5' dans les conditions de déprotection basique.

Ainsi, T. KEMPE et al, dans "Nucleic Acids Research", 1982, 10, 6695-6714, ont rapporté des rendements de synthèse d'oligoribonucléotides très 30 faibles en protégeant le groupe hydroxyle en position 2' du ribose, avec un groupe acyle tel qu'un groupe acétyle ou benzoyle.

Le groupe *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) est certainement le plus utilisé pour la protection de l'hydroxyle en 2' du ribose. Si plusieurs protections ont été proposées pour le remplacer, telles que les groupes triisopropylsilyloxyméthyle (TOM), bis(2-acétoxyéthyloxy)méthyle (ACE), *tert*-butyldithiométhyle (DTM), 1-(2-cyanoéthoxy)éthyle (CEE), 2-cyanoéthoxyméthyle (CEM), 2-(4-toluylsulfonyl)éthoxyméthyle (TEM), lévulinyle et 2-cyanoéthyle, la plupart de ces groupes sont, comme le TBDMS, éliminés par des ions fluorures. Mais une déprotection par des ions fluorures est un obstacle majeur pour obtenir des oligoribonucléotides purs en raison de leur pollution par des sels, menant à 10 des procédures additionnelles longues de purification.

L'invention vise à pallier les inconvénients des procédés de synthèse chimique d'ARN de l'art antérieur, aussi bien de siARN que d'ARN de plus grande longueur, aussi bien que d'ARN comprenant des nucléobases naturelles que des nucléobases modifiées ou que d'ARN comprenant un cycle 15 ribose naturel ou modifié, en proposant un procédé de synthèse d'ARN, qui utilise un groupe protecteur des hydroxyles en position 2' du ribose qui peut être enlevé par une base, sans attaque nucléophile de l'atome de phosphore et sans rupture des liaisons 3'-5' de l'ARN.

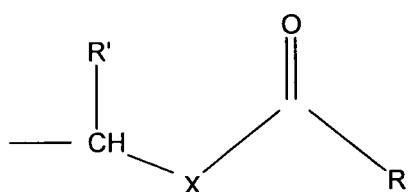
A cet effet, l'invention propose un procédé de libération d'un ARN 20 simple brin, à partir d'un ARN simple brin protégé et lié par un lien à un support solide, de formule I suivante :



Formule I

dans laquelle :

- $X_1$  est H ou un groupe protecteur d'hydroxyle choisi parmi un groupe diméthoxytrityle, un groupe monométhoxytrityle et un groupe pixyle, de préférence un groupe diméthoxytrityle,
- $X_2$  est H ou un groupe protecteur du phosphate  $\beta$ -éliminable, de préférence un groupe cyanoéthyle,
- $X_3$  est un groupe baso-labile protecteur des hydroxydes en position 2' du ribose de formule A suivante :



Formule A

- dans laquelle X est O ou S, R' est H ou  $\text{CH}_3$ , et R est choisi parmi un groupe alkyle en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $\text{R}_1\text{-O-}\text{R}_2$  dans lequel  $\text{R}_1$  est un groupe alkyle en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_2$  et  $\text{R}_2$  est un groupe  $\text{CH}_3$  ou  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-}\text{CH}_3$  ou aryle.

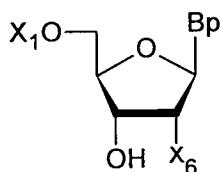
- $X_4$  représente l'ensemble lien-support solide,

- $X_6$  est H ou  $OX_3$  ou OAc,
  - Bp est une nucléobase thymine naturelle ou modifiée lorsque  $X_6$  est H, uracile naturelle ou modifiée lorsque  $X_6$  est  $OX_3$  ou OAc, adénine naturelle ou modifiée protégée, cytosine naturelle ou modifiée protégée, ou guanine naturelle ou modifiée protégée quelque soit  $X_6$ , et
    - n est un entier supérieur ou égal à 0,
- caractérisé en ce qu'il comprend une étape a) de traitement de l'ARN simple brin protégé lié à un support de formule I avec une base choisie parmi la pipéridine, la 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-ène (DBU), et la triéthylamine, à température ambiante, pour libérer les phosphates des liens internucléotidiques 3'-5' lorsque  $X_2$  est différent de H, suivie d'une étape b) de traitement de l'ARN partiellement libéré obtenu à l'étape a), avec une base choisie parmi l'ammoniaque concentré, la méthylamine, le carbonate de potassium, à température ambiante.
- De préférence, dans la formule I,  $X_3$  est un groupe de formule A.  
Plus préférablement, dans la formule I,  $X_3$  est choisi parmi un groupe pivaloyloxyméthyle, un groupe isobutyryloxyméthyle, un groupe *n*-butyryloxyméthyle, un groupe propionyloxyméthyle et un groupe acétyloxyméthyle.
- Dans un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé de libération de l'invention, dans la formule I, la nucléobase Bp est l'uracile naturelle ou modifiée.
- Dans un second mode de mise en œuvre préféré du procédé de libération de l'invention, dans la formule I, les quatre nucléobases uracile, adénine, cytosine et guanine, naturelles ou éventuellement et indépendamment l'une de l'autre modifiées sont présentes, et à l'étape b), l'enlèvement du groupe  $X_3$  est effectué préférentiellement par un traitement avec une solution aqueuse d'ammoniaque à 28% puis ajout de 15% en volume, par rapport au volume d'ammoniaque, d'isopropylamine puis évaporation sous pression réduite.
- Dans un troisième mode de mise en œuvre préféré du procédé de libération de l'invention, l'ARN protégé et lié à un support de formule I est lié à un support solide par un lien baso-labile.

Dans un quatrième mode de mise en œuvre préféré du procédé de libération de l'invention, dans la formule I, les quatre nucléobases naturelles ou éventuellement modifiées, indépendamment l'une de l'autre, thymine, adénine, cytosine, et guanine sont présentes lorsque  $X_6$  est H.

5 L'invention propose également un procédé de synthèse d'un ARN simple brin caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) liaison, à un support, par un lien, d'un monomère de formule II suivante

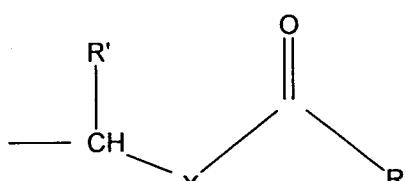


10 Formule II

dans laquelle :

- Bp est une nucléobase naturelle ou modifiée, cette nucléobase étant une nucléobase uracile lorsque  $X_6$  est  $OX_3$  ou OAc, ou une nucléobase thymine lorsque  $X_6$  est H, ou une nucléobase adénine protégée ou 15 une nucléobase cytosine protégée ou une nucléobase guanine protégée, quelque soit  $X_6$

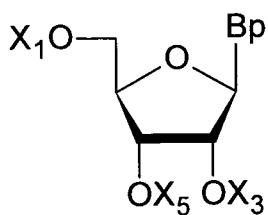
- $X_1$  est un groupe diméthoxytrityle,
- $X_6$  est H ou un groupe OAc ou  $OX_3$  dans lequel  $X_3$  est un groupe de formule A suivante :



20 Formule A

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou  $CH_3$ , et R est choisi parmi un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $R_1-O-R_2$  dans lequel  $R_1$  est un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_2$  et  $R_2$  est un groupe  $CH_3$  ou  $CH_2CH_2-O-CH_3$  ou 25 aryle,

- b) assemblage du monomère de formule II lié à son support obtenu à l'étape a) avec au moins un monomère de formule III suivante :



Formule III

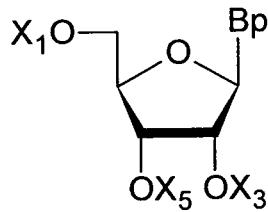
dans laquelle  $X_1$ , Bp, et  $X_3$  sont tels que définis pour la formule II et  $X_5$  est un groupe hydrogénophosphonate monoester ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite, ce par quoi on obtient un ARN simple brin protégé lié à un support de formule I,

- c) optionnellement, traitement par un milieu acide de l'assemblage obtenu à l'étape b), et
- d) libération de l'ARN simple brin protégé lié à un support obtenu à l'étape b) ou à l'étape c), par le procédé de libération de l'invention.

L'invention propose aussi un procédé de synthèse d'un ARN double brin caractérisé en ce qu'il comprend la synthèse d'un ARN simple brin selon le procédé de synthèse d'ARN simple brin de l'invention, et l'hybridation de cet ARN simple brin ainsi synthétisé avec un ARN simple brin ayant une séquence complémentaire.

De préférence, l'ARN double brin est un siARN.

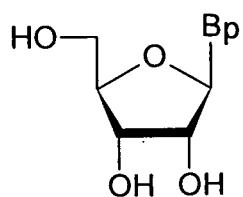
Mais l'invention propose encore un procédé de synthèse d'un monomère de formule III suivante:



Formule III

dans laquelle  $X_1$ , Bp,  $X_3$  sont tels que définis pour la formule II et  $X_5$  est un groupe hydrogénophosphonate ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite, ce par quoi on obtient un ARN simple brin protégé à un support de formule I,

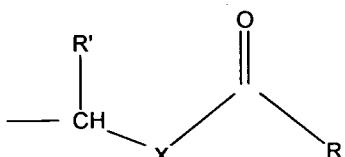
à partir d'un monomère ribonucléoside de formule IV suivante :



Formule IV

dans laquelle Bp est tel que défini pour la formule II,  
caractérisé en ce qu'il consiste en les étapes suivantes :

- 5 a) protection des amines exocycliques des nucléobases Bp,
- lorsque la nucléobase Bp est différente de l'uracile, éventuellement modifiée,
- b) protection de l'hydroxyle en position 5' du sucre ribose,
- c) protection de l'hydroxyle en position 2' du sucre ribose avec un groupe de formule A suivante, et



Formule A

10

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou CH<sub>3</sub>, et R est choisi parmi un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub> linéaire ou ramifié et un groupe R<sub>1</sub>-O-R<sub>2</sub> dans lequel R<sub>1</sub> est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>2</sub> et R<sub>2</sub> est un groupe CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> ou aryle,

15

d) fonctionnalisation de l'hydroxyle en position 3' du sucre ribose avec un groupe hydrogénophosphonate monoester ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite.

20

Plus préférablement, à l'étape c), le groupe de formule A est un groupe pivaloyloxyméthyle ou un groupe isobutyryloxyméthyle ou un groupe *n*-butyryloxyméthyle, ou un groupe propionyloxyméthyle ou un groupe acétyloxyméthyle.

Egalement de préférence, à l'étape b), le groupe protecteur est un groupe diméthoxytrityle.

25

Dans un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé de synthèse du monomère de formule III selon l'invention, la nucléobase est la

cytosine, naturelle ou modifiée, et le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe acétyle.

Dans un second mode de mise en œuvre préféré du procédé de synthèse du monomère de formule III selon l'invention, la nucléobase est 5 l'adénine, naturelle ou modifiée, et le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe phénoxyacétyle.

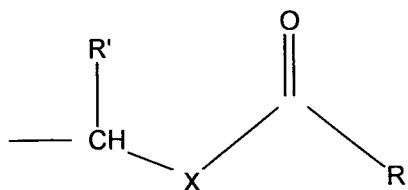
Dans un troisième mode de mise en œuvre préféré du procédé de synthèse du monomère de formule III selon l'invention, la nucléobase est la guanine, naturelle ou modifiée, et le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe 10 *tert*-butylphénoxyacétyle ou *isopropylphénoxyacétyle*.

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et caractéristiques de celle-ci apparaîtront plus clairement à la lecture de la description explicative qui suit.

Dans l'invention, les termes « nucléobase(s) Bp » ou « Bp » 15 désignent une nucléobase uracile, adénine, cytosine ou guanine, éventuellement modifiée, protégée ou non comme cela apparaîtra clairement à l'homme de l'art.

L'invention représente une rupture dans les stratégies antérieures de synthèse d'ARN, quel que soit le nombre d'unités ribonucléotidiques le composant, et que ces unités ribonucléotidiques soient des unités naturelles ou 20 modifiées, par voie chimique, en ce qu'elle utilise des groupements protecteurs des différentes fonctions réactives sur les ribonucléotides, dont en particulier les groupes protecteurs des phosphates des liens internucléotidiques 3'-5, lorsqu'on utilise la voie de synthèse aux phosphoramidites, et les groupes protecteurs des hydroxyles en position 2' des cycles riboses, qui sont enlevés dans des conditions 25 basiques, à la fin de l'elongation de l'ARN. Ceci permet, lorsque les groupements protecteurs des nucléobases, lorsque présents, et le lien liant l'ARN synthétisé protégé au support sont également baso-labiles, d'utiliser une stratégie de synthèse d'ARN entièrement baso-labile. L'invention est donc une rupture du dogme "la synthèse d'ARN est incompatible avec une stratégie entièrement baso- 30 labile".

La caractéristique clé permettant d'utiliser une telle stratégie entièrement baso-labile, est l'utilisation, pour protéger l'hydroxyle en position 2' du sucre ribose, de groupes protecteurs de formule A suivante :



Formule A

5

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou CH<sub>3</sub>, et R est choisi parmi un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub> linéaire ou ramifié et un groupe R<sub>1</sub>-O-R<sub>2</sub> dans lequel R<sub>1</sub> est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>2</sub> et R<sub>2</sub> est un groupe CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> ou aryle.

10

Plus préférablement, ces groupes protecteurs de formule A sont des groupes pivaloyloxyméthyle ou isobutyryloxyméthyle ou butyryloxyméthyle ou propionyloxyméthyle ou acétyloxyméthyle.

15

En effet, l'utilisation de tels groupes protecteurs permet de libérer les hydroxyles en position 2' du ribose de l'ARN voulu par un traitement avec une base, sans rupture de l'ARN et sans contamination par les sels fluorures utilisés dans l'art antérieur.

20

Les groupements protecteurs pivaloyloxyméthyle, acétyloxyméthyle, pivaloylthiométhyle, et acétylthiométhyle ont déjà été introduits en position 2' du cycle ribose, formant avec l'OH en position 2' du cycle ribose, un groupement O-pivaloyloxyméthyle, O-acétyloxyméthyle, O-pivaloylthiométhyle ou O-acétylthiométhyle, respectivement, dans le but d'améliorer certaines propriétés de l'ARN protégé, en particulier sa perméabilité aux membranes cellulaires, sa résistance aux nucléases, comme décrit dans Parey et al, "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA, Organic Letters", 2006, Vol.8, No.17, 3869-3872.

Dans cet article, les groupes acétales, et en particulier les groupes pivaloyloxyméthyle, acétyloxyméthyle, pivaloylthiométhyle et acétylthiométhyle, sont décrits comme des groupes pouvant permettre à l'ARN ainsi fonctionnalisé en position 2' du cycle ribose, de traverser la membrane

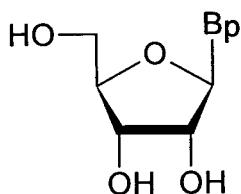
cellulaire et, là, d'être déprotégé par la cellule elle-même avec son contenu enzymatique. Ces groupements protecteurs étaient donc décrits comme des groupements bio-labiles et rien dans ce document ne suggère que l'utilisation de tels groupements protecteurs permettrait d'utiliser une stratégie de synthèse 5 d'ARN avec protections baso-labiles déprotégé dans des conditions basiques.

De plus, dans ce document, l'introduction sélective du groupement acétalester en position 2' du monomère ribonucléosidique est effectué par une synthèse dans laquelle le réactif de Markiewicz ( $\text{TIPSiCl}_2$ ) bloque simultanément les hydroxyles en positions 5' et 3' du ribose et laisse l'hydroxyle en 2' du ribose 10 libre pour accepter le groupement pivaloyloxyméthyle, acétyloxyméthyle, pivaloylthiométhyle ou acétylthiométhyle, selon le groupement choisi. Cette méthode permet d'éviter l'obtention et la séparation des différents isomères 2' et 3' protégés mais elle requiert au moins sept étapes pour la synthèse de l'ARN protégé.

15 Bien que ces sept étapes se déroulent avec des rendements élevés, elles sont consommatrices de temps et le  $\text{TIPSiCl}_2$  est un réactif coûteux.

L'invention, en contraste, propose un procédé de synthèse du monomère ribonucléosidique dont la nucléobase, et les hydroxyles en position 3' et 5' du ribose sont protégés de manière tout à fait classique dans l'art, l'hydroxyle 20 en position 2' du sucre ribose étant protégé par un groupe acyloxyalkyle ou acylthioalkyle, plus préférablement acyloxyméthyle, qui se déroule en quatre étapes avec un rendement final compris entre 27% et 37%.

Dans ce procédé on part, comme dans l'art antérieur, des composés de formule IV suivante :



25

Formule IV

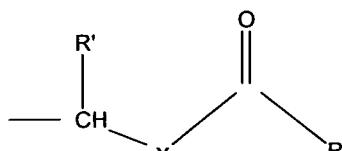
dans laquelle Bp est une nucléobase naturelle ou modifiée, uracile, adénine, cytosine, ou guanine.

La première étape de ce procédé consiste à protéger la nucléobase, lorsque celle-ci est différente de l'uracile.

La seconde étape consiste à protéger l'hydroxyle en position 5' du cycle ribose avec un groupe protecteur classiquement utilisé par l'homme du métier à cet effet. Ces groupes protecteurs classiques utilisés dans l'art pour protéger l'hydroxyle en position 5' du cycle du ribose sont, entre autres, les groupes diméthoxytrityle, monométhoxytrityle et pixyle.

Dans l'invention, le groupe protecteur préféré utilisé est un groupe diméthoxytrityle acido-labile largement utilisé en synthèse d'oligonucléotides.

La troisième étape du procédé de synthèse d'un monomère ribonucléotidique, qui sert d'unité de construction pour l'assemblage d'une chaîne menant à l'obtention d'un ARN simple brin, est la protection de l'hydroxyle en position 2' du ribose par un groupement de formule A suivante :



Formule A

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou CH<sub>3</sub>, et R est choisi parmi un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub> linéaire ou ramifié et un groupe R<sub>1</sub>-O-R<sub>2</sub> dans lequel R<sub>1</sub> est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>2</sub> et R<sub>2</sub> est un groupe CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> ou aryle.

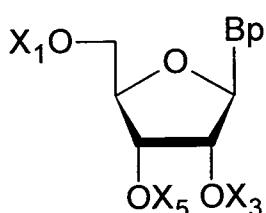
Plus préféablement, le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est un groupe pivaloyloxyméthyle ou un groupe isobutyryloxyméthyle, ou un groupe *n*-butyryloxyméthyle, ou un groupe propionyloxyméthyle, ou un groupe acétyloxyméthyle.

Le plus préféablement, le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est un groupe pivaloyloxyméthyle.

A cette étape, on obtient deux isomères : l'un avec le groupe hydroxyle en position 3' du ribose naturel ou modifié protégé par le groupe de formule A, et l'autre avec le groupe hydroxyle en position 2' du ribose naturel ou modifié protégé par le groupe de formule A.

L'isomère dont l'hydroxyle en position 2' du cycle ribose est protégé, est séparé et la quatrième étape du procédé de synthèse du monomère ribonucléotidique protégé selon l'invention consiste alors à fonctionnaliser l'hydroxyle en position 3' du ribose par un groupement phosphorylé bien connu de l'homme du métier. De préférence, dans un premier mode de réalisation, dans le procédé de l'invention on utilise un groupe phosphoramidite, le plus préférablement un groupe 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite.

Le composé de formule III suivante est alors obtenu :



Formule III

dans laquelle :

- Bp est une nucléobase naturelle ou modifiée, uracile ou une nucléobase adénine protégée ou une nucléobase cytosine protégée ou une nucléobase guanine protégée,

- X<sub>1</sub> est un groupe protecteur d'hydroxyle, choisi parmi des groupements acido-labiles et préférentiellement le groupe diméthoxytrityle,

- X<sub>5</sub> est un groupe phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite,

- X<sub>3</sub> est un groupe de formule A telle que définie

précédemment.

Mais, dans un second mode de réalisation, dans le procédé de l'invention, on utilise, pour la fonctionnalisation de l'hydroxyle en position 3', un groupe hydrogénophosphonate monoester.

Le composé de formule III qui est alors obtenu est un composé de formule III dans lequel Bp, X<sub>1</sub>, et X<sub>3</sub> sont tels que définis précédemment mais X<sub>5</sub> est un groupe hydrogénophosphonate monoester.

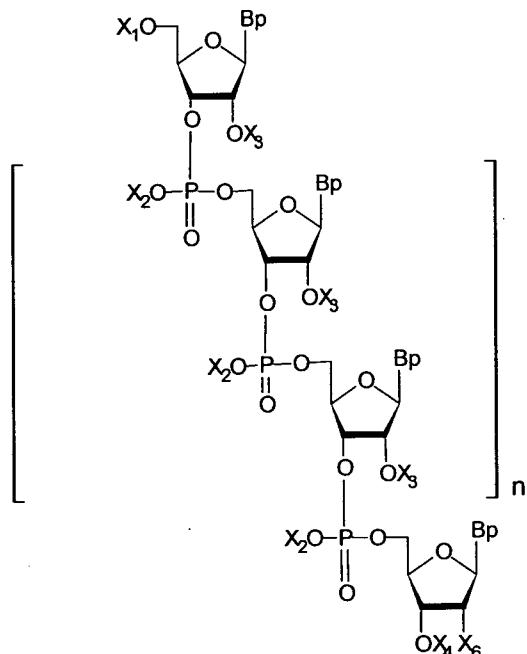
A partir des monomères ribonucléotidiques de formule III et du monomère ribonucléotidique de formule II dans laquelle X<sub>6</sub> est OX<sub>3</sub> ou OAc ou

désoxyribonucléotidique de formule II dans laquelle X<sub>6</sub> est H, un ARN simple brin protégé est synthétisé sur support solide.

Le procédé de synthèse de cet ARN simple brin protégé est également un objet de l'invention.

5

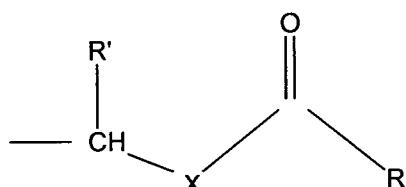
Cet ARN simple brin protégé a la formule I suivante :



Formule I

dans laquelle :

- X<sub>1</sub> est H ou un groupe protecteur d'hydroxyle choisi parmi des groupements acido-labiles et préférentiellement un groupe diméthoxytrityle,
- 10 - X<sub>2</sub> est H ou un groupe protecteur du phosphate, de préférence un groupe 2-cyanoéthyle,
- X<sub>3</sub> est un groupe de formule A suivante :



Formule A

15

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou CH<sub>3</sub>, et R est choisi parmi un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub> linéaire ou ramifié et un groupe R<sub>1</sub>-O-R<sub>2</sub> dans lequel

$R_1$  est un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_2$  et  $R_2$  est un groupe  $CH_3$  ou  $CH_2CH_2-O-CH_3$  ou aryle,

-  $X_4$  représente l'ensemble du support solide et du lien qui relie l'oligonucléotide au support. Le support peut être des billes de verre (LCA-CPG : long chain alkylamine-controlled pore glass) ou des billes de résine polystyrène (HCP : highly cross-linked polystyrene). Le lien est choisi parmi des liens rompus par une base à la fin de l'élongation tels que oxalyle, succinyle, glyoxal, hydroquinone-O,O-diacetic acid (Q-linker) et préférentiellement le lien succinyle ou Q-linker ,

- $X_6$  est H ou un groupe  $OX_3$  ou  $OAc$ ,
- $Bp$  est une nucléobase naturelle ou modifiée, thymine lorsque  $X_6$  est H ou uracile lorsque  $X_6$  est  $OX_3$  ou  $OAc$  ou alors adénine protégée, ou cytosine protégée, ou guanine protégée, quelque soit  $X_6$ , et,
- $n$  est un entier supérieur ou égal à 0.

Lorsque  $X_6$  est  $OAc$ , les positions de  $X_4$  et  $X_6$  sont interchangeables.

Le procédé de synthèse selon l'invention de cet ARN simple brin comprend une étape de liaison d'un monomère ribonucléosidique ou désoxyribonucléosidique de formule II avec un support tel que défini précédemment, par l'intermédiaire d'un lien de préférence lui aussi baso-labile, suivie d'une étape d'assemblage d'un tel monomère de formule II avec au moins un monomère de formule III, et, optionnellement d'une étape de traitement acide de l'assemblage de monomères obtenu pour enlever le groupe protecteur  $X_1$ , enfin, une étape de libération de l'ARN protégé ainsi obtenu.

Ainsi, l'ARN sur lequel l'étape de libération est mise en œuvre est soit un ARN de formule I dans laquelle  $X_1$  est H lorsque l'étape de traitement acide est effectuée, soit un ARN de formule I dans laquelle  $X_1$  est un groupe protecteur d'hydroxyle lorsque l'étape de traitement acide n'est pas effectuée.

L'assemblage des monomères ribonucléotidiques de formule III se fait généralement par synthèse automatisée sur un support solide.

Dans ce cas, l'ARN protégé synthétisé est lié, par son extrémité  $X_4$  en position 3', par un lien au support solide.

Lorsque ce lien est également baso-labile, la libération de l'ARN de son support se fait, dans le procédé de l'invention, en même temps que la déprotection de l'OH en position 2' du ribose, et sans étape additionnelle.

Cela est vrai pour tout lien baso-labile.

Une fois l'ARN simple brin libéré, un ARN double brin peut être alors formé par hybridation de l'ARN simple brin libéré avec un ARN simple brin ayant une séquence complémentaire. L'ARN simple brin ayant une séquence complémentaire peut, lui aussi, avoir été synthétisé par le procédé de l'invention, ou encore avoir été synthétisé par un autre procédé.

Cela permet en particulier de pouvoir fabriquer des siARN.

Le procédé de libération de l'ARN simple brin protégé de formule I est un objet de l'invention. Ce procédé surmonte un préjugé de l'art antérieur en ce qu'il consiste à éliminer les groupes protecteurs des hydroxyles en positions 2' du ribose par un traitement basique.

Plus précisément, ce traitement basique comprend une étape a) de traitement de l'ARN protégé de formule I avec une base forte choisie parmi la pipéridine, la 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU), la triéthylamine, à température ambiante, pour libérer le phosphate des liens internucléotidiques 3'-5'.

Cette étape a) n'est effectuée que lorsque la voie de synthèse aux phosphoramidites est utilisée.

En effet, lorsque la voie de synthèse aux hydrogénophosphonates est utilisée, l'assemblage des monomères mène à l'obtention de liens internucléosidiques 3'-5' hydrogénophosphonates diesters qui sont ainsi ensuite oxydés en phosphates pour obtenir un ARN, qui sera alors à libérer par le procédé de l'invention, de formule I dans laquelle X<sub>2</sub> est H.

Cette étape a) éventuelle est suivie d'une étape b) de traitement de l'ARN ainsi partiellement libéré obtenu à l'étape a), avec une base forte choisie parmi l'ammoniaque concentré, la méthylamine, le carbonate de potassium à température ambiante.

L'étape b) est elle commune pour la libération de l'ARN quelle que soit la voie de synthèse de l'ARN utilisée.

Le traitement avec la pipéridine ou la DBU à température ambiante se fait dans tout solvant approprié connu de l'homme du métier, et plus préféablement dans le THF ou l'acétonitrile sec, pendant 15 minutes (pipéridine) ou 45 minutes (DBU 0.45M) ou 1 minute (DBU 1M).

5                 Après cette déprotection du phosphate du lien internucléotidique 3'-5', les groupes protecteurs pivaloyloxyméthyle, *isobutyryloxyméthyle*, *n*-butyryloxyméthyle, propionyloxyméthyle, acétyloxyméthyle, selon le groupement utilisé, sont toujours en place.

10                Puis les groupes hydroxyles en position 2' sont libérés par traitement avec de l'ammoniac aqueux concentré, à température ambiante, pendant 3h. Aucune rupture des ARN ne se produit à cette étape. Cette déprotection séquentielle en deux étapes avec d'abord la DBU ou la pipéridine puis avec l'ammoniac aqueux est nécessaire pour éviter l'attaque par des hydroxyles en position 2' libérés, des phosphotriesters ou des phosphodiesters 15 avoisinants, ce qui pourrait mener à une rupture de chaîne.

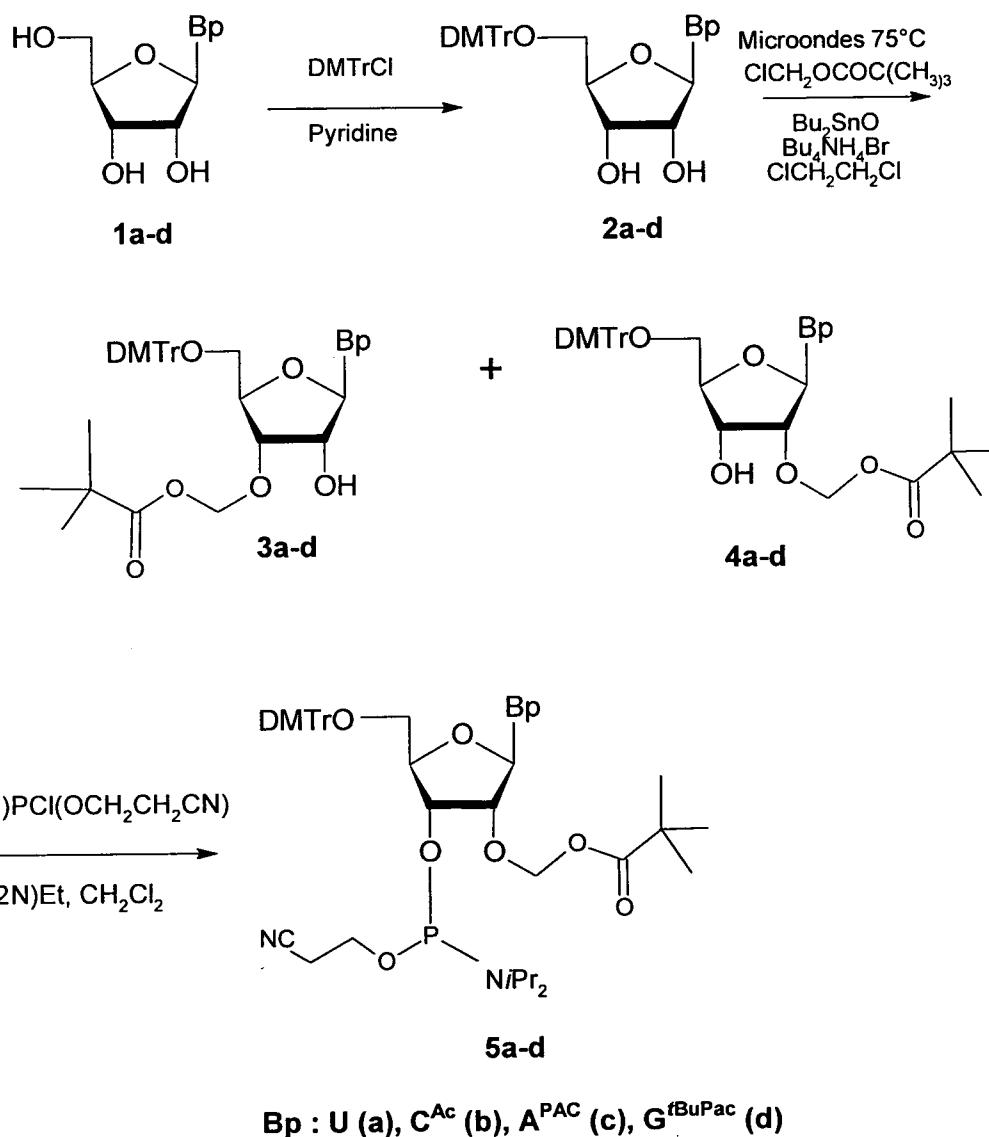
20                Cependant, lorsque l'ARN protégé de formule I contient les nucléobases naturelles ou modifiées : thymine ou uracile, adénine, cytosine et guanine c'est-à-dire au moins quatre monomères de formule III dans lesquels les nucléobases sont toutes différentes, le procédé de libération de l'invention comprend de plus une étape d'addition de 15% d'isopropylamine après le traitement avec l'ammoniaque.

Dans tous les cas, le milieu de déprotection est évaporé sous pression réduite, pour obtenir l'ARN libéré pur.

25                Afin de mieux faire comprendre l'invention, on va maintenant en décrire, à titre d'exemples purement illustratifs et non limitatifs plusieurs modes de mise en œuvre.

30                Dans les exemples qui suivent, les monomères ribonucléotidiques de formule III avec X<sub>5</sub> est un groupe phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite ont été synthétisés selon le schéma général suivant :

18



Dans ce schéma, la première étape de protection des bases guanine, cytosine et adénosine n'est pas indiquée.

5 Dans ce schéma, Bp peut être aussi G<sup>PrPAC</sup>, auquel cas, l'étape d'introduction du groupe pivaloyloxyméthyl en position 2' du composé **2a-d** s'effectue sans traitement aux micro-ondes, comme cela sera expliqué ci-après.

**Exemple 1 : Synthèse du monomère 2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityle) uridine-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite 5a.**

Le monomère synthétisé ici a la formule III dans laquelle la  
 5 nucléobase est une nucléobase uracile, le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 5' du ribose est le diméthoxytrityle, le groupe greffé sur l'hydroxyle en position 3' du ribose est le 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite, et le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est le pivaloyloxyméthyle.

Pour cette synthèse, on démarre de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine 2a. Il n'y a donc plus qu'à introduire dans une première étape le groupement pivaloyloxyméthyle en position 2' du ribose et le groupe 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite en position 3' du monomère.

Pour cela, le groupe pivaloyloxyméthyle est d'abord introduit en position 2' du ribose.

15 Plus précisément, on ajoute à une solution de 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine 2a (2,5 g, 4,6 mmol, 1 eq) dans du dichloroéthane (DCE) (15 mL), du bromure de tétrabutylammonium (1,93 g, 5,98 mmol, 1,3 eq), de l'oxyde de dibutylétain (1,5 g, 5,98 mmol, 1,3 eq) et du chlorométhyl pivalate (1,67 mL, 11,5 mmol, 2,5 eq).

20 Le milieu réactionnel est chauffé sous irradiations micro-ondes (puissance 300 W) à 75°C pendant 2h30, refroidi et le solvant est évaporé.

Puis, le mélange réactionnel est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'acétone (0-40%) dans du dichlorométhane. L'isomère éluant en premier est le composé désiré 4a. Il est  
 25 obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement 4a : 1,1 g, 36%

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,57 (s, 1H, NH); 7,94 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6); 7,37-7,09 (m, 9H, H ar, DMTr); 6,83-6,69 (m, 4H, H ar, DMTr); 5,87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1'/H2'</sub> = 1.8 Hz, 1H, H-1'); 5,52, 5,37 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 6,3 Hz, 1H+1H, OCH<sub>2</sub>O);  
 30 5,23 (d, J<sub>H-5/H-6</sub> = 8,1 Hz, 1H, H-5); 4,39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H3'/OH3'</sub> = 8,8 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H3'/H4'</sub> = 7,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H3'/H2'</sub> = 5,2 Hz, 1H, H-3'); 4,24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'/H3'</sub> = 5,2 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H2'/H1'</sub> = 1,8 Hz, 1H, H-2'); 3,95 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H4'/H3'</sub> = 7,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H4'/H5',H5''</sub> = 2,1 Hz, 1H, H-4'); 3,71 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>); 3,48

(dd,  $^2J_{H5'/H5''} = 11,2$  Hz;  $^3J_{H5'/H4'} = 2,1$  Hz, 1H, H-5'); 3,42 (dd,  $^2J_{H5''/H5'} = 11,2$  Hz;  $^3J_{H5''/H4'} = 2,1$  Hz, 1H, H-5''); 2,48 (d,  $J_{OH-3'/H-3'} = 8,8$  Hz, 1H, OH<sub>3</sub>'); 1,15 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 177,1 (OC=O); 162,5 (C=O); 157,7; 157,6; 143,3; 134,2; 133,9 (Cq, Car); 149,2 (C=O); 138,8 (C<sub>6</sub>); 129,2; 129,1; 5 127,1; 127,0; 126,2; 112,3 (CH, Car); 101,2 (C<sub>5</sub>); 87,2 (C<sub>1'</sub>); 86,9 (OCH<sub>2</sub>O); 86,1 (OCq, DMTr); 82,2 (C<sub>4'</sub>); 81,1 (C<sub>2'</sub>); 67,5 (C<sub>3'</sub>); 60,1 (C<sub>5'</sub>); 54,2 (OCH<sub>3</sub>, DMTr); 37,8 (Cq, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 25,9 (OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB) calculé pour : C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> 660,2709; trouvé : 660,2683.

A partir du 2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine 10 **4a** ainsi obtenu, le 2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine 3'-O-(2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **5a** a été obtenu de la façon suivante :

Le 2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine obtenu à l'étape précédente **4a** (1g, 1,51 mmol, 1 eq) est séché par trois coévaporations avec du CH<sub>3</sub>CN anhydre. Puis le résidu est dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (10 mL) et un mélange de *N,N*-diisopropyléthylamine (474 µL, 2,72 mmol, 1,8 eq), de 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (506 µL, 2,27 mmol, 1,5 eq) et de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité sous argon, à température ambiante pendant 3h.

Après cela, de l'acétate d'éthyle est ajouté, le mélange réactionnel 20 est versé dans une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturé et des extractions avec AcOEt sont effectuées. Le mélange obtenu après séchage de l'extrait sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, élimination du solvant, est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60-100%) dans du cyclohexane avec 1% de pyridine. Le monomère de formule III désiré **5a** est obtenu. Il se présente sous la forme d'une 25 mousse blanche, après évaporation du solvant.

Rendement **5a** : 1,05 g, 81%.

RMN <sup>31</sup>P(121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 150,35; 149,20.

**Exemple 2 : Synthèse du  $N^4$ -acétyl-2'-O-pivaloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) cytidine-3'-O-(2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropyl phosphoramidite 5b.**

Ce monomère ribonucléotidique de formule III est le monomère dans lequel la nucléobase est la cytosine, le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 5' du ribose est le diméthoxytrityle, le groupement greffé sur l'hydroxyle en position 3' du ribose est le 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite et le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est le pivaloyloxyméthyle.

On part dans cette synthèse du  $N^4$ -acétyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) cytidine 2b, ce qui signifie que cet exemple décrit la protection des OH en position 2' et 3' du ribose.

Ces protections ont été effectuées de la manière suivante :

A une solution de  $N^4$ -acétyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)cytidine 2b (2,5 g, 4,26 mmol, 1 eq) dans du DCE (15 mL) est ajouté du bromure de tétrabutyl ammonium (1,78 g, 5,54 mmol, 1,3 eq), de l'oxyde de dibutylétain (1,39 g, 5,54 mmol, 1,3 eq), et du chlorométhyl pivalate (1,55 mL, 10,65 mmol, 2,5 eq). Le mélange réactionnel est chauffé sous irradiations micro-ondes (puissance 300 W) à 75°C pendant 2h30, refroidi et le solvant est évaporé.

Le mélange réactionnel est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'acétone (40-100%) dans du dichlorométhane.

L'isomère éluant en premier est le composé désiré 4b qui est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement 4b : 1,14 g, 38%.

RMN  $^1$ H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,84 (s, 1H, NH); 8,42 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 7,5 Hz, 1H, H-6); 7,34-7,14 (m, 9H, H ar, DMTr); 7,06 (d, J<sub>H-5/H-6</sub> = 7,5 Hz, 1H, H-5); 6,80-6,76 (m, 4H, H ar, DMTr); 5,86 (s, 1H, H-1'); 5,60; 5,50 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 6,1 Hz, 1H+1H, OCH<sub>2</sub>O); 4,34 (dt,  $^3$ J<sub>H3'/OH3'</sub> = 10,6 Hz;  $^3$ J<sub>H3'/H4',H2'</sub> = 5,2 Hz, 1H, H-3'); 4,21 (d,  $^3$ J<sub>H2'/H3'</sub> = 5,2 Hz, 1H, H-2'); 3,98 (dt,  $^3$ J<sub>H4'/H3'</sub> = 5,2 Hz;  $^3$ J<sub>H4'/H5',H5''</sub> = 1,9 Hz, 1H, H-4'); 3,71 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>); 3,52 (dd,  $^2$ J<sub>H5'/H5''</sub> = 11,1 Hz;  $^3$ J<sub>H5'/H4'</sub> = 1,9 Hz, 1H, H-5'); 3,48 (dd,  $^2$ J<sub>H5''/H5'</sub> = 11,1 Hz;  $^3$ J<sub>H5''/H4'</sub> = 1,9 Hz, 1H, H-5''); 2,50 (d, J<sub>OH-3'/H-3'</sub> = 10,6

Hz, 1H, OH<sub>3'</sub>); 2,19 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>); 1,13 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 178,2 (OC=O); 170,6 (NHCO); 163,1 (C<sub>4</sub>); 158,7 (Cq, Car); 147,4 (C<sub>2</sub>); 146,6 (C<sub>6</sub>); 146,3; 135,2 (Cq, Car); 130,1; 129,2; 128,2; 128; 127,9; 127,8; 127,2; 127; 113,3; 113,1 (CH, Car); 96,8 (C<sub>5</sub>); 91,5 (C<sub>1'</sub>); 88,0 (OCH<sub>2</sub>O); 87,6 5 (OCq, DMTr); 83,1 (C<sub>4</sub>); 81,7 (C<sub>2'</sub>); 67,8 (C<sub>3'</sub>); 60,7 (C<sub>5'</sub>); 55,3 (OCH<sub>3</sub>, DMTr); 38,9 (Cq, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27,0 (OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 18,1 (COCH<sub>3</sub>). HRMS (FAB) calculé pour C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 702,3042; trouvé : 702,3027.

Puis, 1,3 g, 1,85 mmol, 1 eq du composé ainsi obtenu **4b** sont séchés par trois coévaporations avec du CH<sub>3</sub>CN anhydre. Le résidu obtenu est 10 dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (13 mL) et un mélange de N,N-diisopropyléthylamine (580 μL, 3,33 mmol, 1,8 eq) de 2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (620 μL, 2,78 mmol, 1,5 eq) et de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélangé est agité sous argon, à température ambiante pendant 3h. Après cela, de l'acétate d'éthyle est ajouté, le mélange 15 réactionnel est versé dans une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée et des extractions avec AcOEt sont effectuées. Le mélange obtenu après séchage de l'extrait sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, élimination du solvant, est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de AcOEt (10-80%) dans de l'hexane avec 1% de pyridine.

20 Le monomère ribonucléotidique de formule III voulu **5b** est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement **5b** : 1,37 g, 82%.

RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 150,15; 148,35.

25 **Exemple 3 : Synthèse du N<sup>6</sup>-Phénoxyacétyl-2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) adénosine 3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite) 5c.**

30 Ce composé correspond au monomère de formule III dans lequel la nucléobase est l'adénine dont l'amine est protégée par un groupement phénoxyacétyle, le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 5' du ribose est le diméthoxytrityle, le groupement greffé sur l'hydroxyle en position 3' est le 2-

cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite, et le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est le pivaloyloxyméthyle.

Pour cette synthèse, on part du ribonucléoside **2c** dont la nucléobase et l'hydroxyle en position 5' sont protégés.

A une solution de *N*<sup>6</sup>-phénoxyacétyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) adénosine **2c** (1g, 1,42 mmol, 1eq) dans du DCE (5 mL) est ajouté du tétrabutylammonium bromure (596 mg, 1,85 mmol, 1,3 eq) du dibutylétain oxyde (462 mg, 1,85 mmol, 1,3 eq) et du chlorométhyl pivalate (515 µL, 3,55 mmol, 2,5 eq). Le mélange réactionnel est chauffé sous irradiations micro-ondes (puissance 300 W) à 75°C pendant 2h30, refroidi et le solvant est évaporé. Le mélange réactionnel est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'acétone (0-30%) dans du dichlorométhane. L'isomère éluant en premier est le composé désiré **4c**, sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement **4c** : 395 mg, 34%.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,50 (s, 1H, NH); 8,72 (s, 1H, H-2); 8,25 (s, 1H, H-8); 7,44-6,81 (m, 18H, H ar, DMTr-Pac); 6,22 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1'/H2'</sub> = 4,7 Hz, 1H, H-1'); 5,51; 5,40 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 5,8 Hz, 1H+1H, OCH<sub>2</sub>O); 5,08 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2'/H3',H1'</sub> = 4,7 Hz; 1H, H-2'); 4,88 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>Ph); 4,55 (q, <sup>3</sup>J<sub>H3'/H2',OH3',H4'</sub> = 4,7 Hz, 1H, H-3'); 4,28 (m, 1H, H-4'); 3,79 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>); 3,54 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5'/H5''</sub> = 10,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H5'/H4'</sub> = 3,3 Hz, 1H, H-5'); 3,43 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5''/H5'</sub> = 10,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H5''/H4'</sub> = 4 Hz, 1H, H-5"); 2,75 (d, J<sub>OH-3'/H-3'</sub> = 4,7 Hz, 1H, OH<sub>3'</sub>); 1,17 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 177,9 (OC=O); 166,7 (NHCO); 158,6 (Cq, Car); 157,2 (Cq, Pac); 152,6 (C<sub>2</sub>); 151,5 (C<sub>6</sub>); 148,4 (C<sub>4</sub>); 144,4; 135,5 (Cq, Car); 142,2 (C<sub>8</sub>); 130,1; 129,9; 128,1; 127,9; 122,4; 115; 114,9; 113,2 (CH, Car); 123,2 (C<sub>5</sub>); 89,0 (OCH<sub>2</sub>O); 87,3 (C<sub>1'</sub>); 86,7 (OCq, DMTr); 84,2 (C<sub>4'</sub>); 81,7 (C<sub>2'</sub>); 70,5 (C<sub>3'</sub>); 68,1 (NHCOCH<sub>2</sub>Ph); 62,9 (C<sub>5'</sub>); 55,3 (OCH<sub>3</sub>, DMTr); 38,9 (Cq, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27,0 (OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (FAB) calculé pour C<sub>45</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> : 818,3401; trouvé : 818,3397.

Le composé obtenu **4c** (550 mg, 0,67 mmol, 1 eq) est séché par trois coévaporations avec CH<sub>3</sub>CN anhydre. Puis le résidu est dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (7 mL) et un mélange de *N,N*-diisopropyléthylamine (211 µL, 1,21 mmol, 1,8 eq), de 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (223 µL, 1

mmol, 1,5 eq) et de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité sous argon, à température ambiante pendant 2h. Après cela, de l'acétate d'éthyle est ajouté, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et des extractions avec AcOEt sont effectuées.

5 Le mélange obtenu après séchage de l'extrait sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et élimination du solvant, est purifié par chromatographie sur colonne de gel silice avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40-100%) dans du cyclohexane avec 1% de pyridine. Le monomère ribonucléotidique désiré **5c** est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

10 Rendement **5c** : 540 mg, 79%.

RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ150,85; 150,80.

15 **Exemple 4 : Synthèse du N<sup>2</sup>-tert-butylphénoxyacétyl-2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) guanosine 3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite) 5d.**

Le composé synthétisé dans cet exemple est le monomère de formule III **5d** dans lequel la nucléobase est la guanine protégée par du *tert*-butylphénoxyacétyle, l'hydroxyle en position 5' est le diméthoxytrityle, le groupement greffé sur l'hydroxyle en position 3' est le 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite, et le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est le pivaloyloxyméthyle.

On part ici du ribonucléoside **2d** dont la nucléobase ainsi que le groupement hydroxyle en position 5' du ribose sont protégés.

A une solution de N<sup>2</sup>-*tert*-butylphénoxyacétyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) guanosine **2d** (2,6 g, 3,35 mmol, 1 eq) dans du DCE (15 mL) est ajouté du tétrabutylammonium bromure (1,4 g, 4,36 mmol, 1,3 eq), de l'oxyde de dibutylétain (1,1 g, 4,36 mmol, 1,3 eq), et du chlorométhyl pivalate (1,22 mL, 8,38 mmol, 2,5 eq). Le mélange réactionnel est chauffé sous irradiations micro-ondes (puissance 300 W) à 75°C pendant 2h, refroidi et le solvant est évaporé. Le mélange réactionnel est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'acétone (0-15%) dans du dichlorométhane. L'isomère

éluant en premier est le composé désiré **4d** qui est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement **4d** : 1,46 g, 49%.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>): δ 11,78 (s, 1H, NH-1); 9,09 (s, 1H, NH<sub>Pac</sub>); 5 7,79 (s, 1H, H-8); 7,36-6,73 (m, 18H, H ar, DMTr-tbuPac); 5,99 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1'/H2'</sub> = 4,7 Hz, 1H, H-1'); 5,46; 5,36 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 5,3 Hz, 1H+1H, OCH<sub>2</sub>O); ); 5,23 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>Ph); 4,65 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2'/H3',H1'</sub> = 4,7 Hz; 1H, H-2'); 4,34 (m, 1H, H-3'); 4,17 (m, 1H, H-4'); 3,70 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>); 3,38 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5'/H5''</sub> = 10,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H5'/H4'</sub> = 2,7 Hz, 1H, H-5'); 3,35 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5''/H5'</sub> = 10,7 Hz; <sup>3</sup>J<sub>H5''/H4'</sub> = 2,9 Hz, 1H, H-5''); 2,49 (d, J<sub>OH-3'/H-3'</sub> = 10 4,3 Hz, 1H, OH<sub>3</sub>'); 1,24 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,10 (s, 9H, tbuPac). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 177,9 (OC=O); 169,9 (NHCO); 158,6 (Cq, Car); 155,2 (C<sub>6</sub>); 154,2 (Cq, tbuPac); 147,7 (C<sub>2</sub>); 146,5 (C<sub>4</sub>); 145,9 (Cq, tbuPac); 144,3; 135,5 (Cq, Car); 137,0 (C<sub>8</sub>); 130,1; 128,1; 127,1; 126,9; 126,8; 114,4; 113,3 (CH, Car); 122,3 (C<sub>5</sub>); 89,3 (OCH<sub>2</sub>O); 86,8 (OCq, DMTr); 86,1 (C<sub>1'</sub>); 84,0 (C<sub>2'</sub>); 82,7 (C<sub>4'</sub>); 70,4 (C<sub>3'</sub>); 67,1 15 (NHCOCH<sub>2</sub>Ph); 63,1 (C<sub>5'</sub>); 55,3 (OCH<sub>3</sub>, DMTr); 38,9 (Cq, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 34,3 (Cq, PhC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31,4 (PhC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27 (OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS (ESI) calculé pour C<sub>49</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> : 890,3976; trouvé : 890,3934.

Le composé obtenu **4d** (700 mg, 0,79 mmol, 1 eq.) est séché par 20 trois coévaporations avec du CH<sub>3</sub>CN anhydre. Puis le résidu est dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (5 mL) et un mélange de *N,N*-diisopropyléthylamine (247 µL, 1,42 mmol, 1,8 eq.), de 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (265 µL, 1,19 mmol, 1,5 eq.) et de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 mL) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité sous argon, à température ambiante pendant 3 h. Après cela, de 25 l'acétate d'éthyle est ajouté, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et des extractions avec AcOEt sont effectuées.

Le mélange obtenu après séchage de l'extrait sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et élimination du solvant, est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40-100%) dans du cyclohexane avec 1% de pyridine. 30 Le monomère ribonucléotidique désiré **5d** est obtenu sous la forme d'une mousse blanche après évaporation du solvant.

Rendement **5d** : 646 mg, 75%.

NMR  $^{31}\text{P}$  (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  150.43, 149.67.

Le procédé décrit dans les exemples qui précèdent pour obtenir les composés **4a-d**, et correspondant à la réaction d'introduction du groupement pivaloyloxyméthyle, implique l'utilisation d'un appareil à micro-ondes. Cette utilisation peut être un frein à sa transposition à grande échelle pour la production des ribonucléotides et le développement de la méthodologie de la synthèse d'ARN par le procédé de l'invention. Pour cette raison, l'invention propose également un procédé de synthèse des composés **5** ci-dessus ne comportant pas d'utilisation de micro-ondes. Dans ce procédé, d'une part, la nucléobase Bp est protégée par un groupe *i*PrPAC et, d'autre part, l'étape d'introduction du groupe pivaloyloxyméthyle pour obtenir les composés **4** a été remplacée par la procédure générale suivante:

Les nucléosides **2a-d** sont solubilisés dans du DCE ou de l'acétonitrile anhydre, puis à température ambiante, sous agitation et sous argon sont ajoutés l'oxyde de dibutylétain (DBTO) puis le bromure de tétrabutylammonium (TBAB) puis le chlorométhylpivalate ou le iodométhylpivalate selon la nature du nucléoside. Le milieu réactionnel est alors chauffé et maintenu à 70°C ou 75°C sous argon pendant des temps variant de 1h30 à 6h.

Par exemple, pour les composés dans lesquels Bp est G, on procède de la façon suivante :

**Synthèse du monomère 2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityle) uridine 4a :**

Nucléoside (1 eq), DBTO (1.3 eq), TBAB (1.3 eq), chlorométhylpivalate (2.5 eq) dans acétonitrile à 70°C pendant 3 h.

**Synthèse du N<sup>4</sup>-acétyl-2'-O-pivaloxoxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) cytidine 4b**

Nucléoside (1 eq), DBTO (1.5 eq), TBAB (1.5 eq), chlorométhylpivalate (3 eq) dans DCE à 75°C pendant 6 h.

**Synthèse du N<sup>6</sup>-Phénoxyacétyl-2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) adénosine 4c**

Nucléoside (1 eq), DBTO (1.3 eq), TBAB (1.3 eq), iodométhylpivalate (2.5 eq) dans DCE à 70°C pendant 1 h 30.

**Synthèse du N<sup>2</sup>-iso-propylphénoxyacétyl-2'-O-pivaloyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) guanosine 4e.**

Le composé 4e correspond au composé 4d décrit au schéma général mais dans lequel Bp est protégée par le groupe iPrPAC.

- 5 Nucléoside (1 eq), DBTO (1.3 eq), TBAB (1.3 eq), chlorométhylpivalate (3 eq) dans DCE à 75°C pendant 3 h.

**Exemple 5 : Synthèse d'ARN simple brin de formule I par la chimie des phosphoramidites avec X<sub>3</sub> qui est un groupe pivaloyloxyméthyle.**

10 A partir des monomères obtenus 5a-d aux exemples 1 à 4, des ARN simple brin ont été synthétisés.

Ces ARN protégés de formule I ont été préparés sur un synthétiseur d'ADN ABI modèle 381A à une échelle de 1µmol, en utilisant les monomères 5a-d de formule III obtenus aux exemples 1 à 4, dans les conditions 15 montrées au tableau 1 suivant.

Étape	Opération	Réactif	Temps (s)
1	Déblocage	3% DCA dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60
2	Couplage	0,1 M amidite dans CH <sub>3</sub> CN + 0.3 M BMT dans CH <sub>3</sub> CN	180*
3	Masquage	(Pac) <sub>2</sub> O dans THF/pyridine + 10% NMI dans THF	200
4	Oxydation	0,1M I <sub>2</sub> dans THF/H <sub>2</sub> O/Pyr	20

Tableau 1

DCA = acide dichloroacétique

BMT = benzylmercaptotétrazole

20 (Pac)<sub>2</sub>O = anhydride phénoxyacétique

NMI = N-méthylimidazole

- Un temps de couplage de 300 secondes a également été appliqué pour la synthèse des héteropolymères mais n'améliore pas significativement le rendement de couplage.

Les ARN protégés ON1 à ON5 (SEQ ID NO :1 à SEQ ID NO :5) ont été synthétisés en utilisant du 5-benzylmercaptotétrazole (BMT) en tant qu'activateur, une solution d'iode en tant qu'agent oxydant et un mélange d'anhydride phénoxyacétique (Pac)<sub>2</sub>O dans un mélange de THF/pyridine et *N*-méthylimidazole (NMI) dans du THF en tant que solution de masquage.

Après la déprotection dans les conditions décrites ci-dessus, les oligonucléotides correspondants aux ARN, déprotégés, ont été analysés par RP-HPLC (Dionex DX 600) avec une colonne nucléosil 100-5 C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; Macherey-Nagel), par MALDI-TOF MS (Voyager Perpective Biosystems) et finalement purifiés par HPLC avec une colonne Delta-Pak (7,8 X 300 mm 15μ C<sub>18</sub> 100Å; Waters).

Les ARN notés ON1 à ON5 ont été obtenus et avaient les formules montrées au tableau 2 suivant :

ON <sup>[a]</sup> SEQ ID NO	5'-séquence-3'	CT <sup>[b]</sup>	OY <sup>[c]</sup>	AY <sup>[d]</sup>	Matériau brut <sup>[e]</sup>
1	U <sub>12</sub> dC	180	96,5	99,7	n.d. <sup>[f]</sup>
2	U <sub>19</sub> TT	180	94,2	99,7	140
3	CCC GUA GCU GTT	180	91,1	99,1	86
4	UGC AUC CUC GAU GGU AAC GdCT	300	82,1	99,0	130
5	CGU UAC CAU CGA GCA UCC AdAT	300	83,8	99,1	125

Tableau 2

15 [a] ON = oligoribonucléotides

[b] = temps de couplage (s) dans le cycle de synthèse automatisé

[c] OY = rendement global de couplage (%)

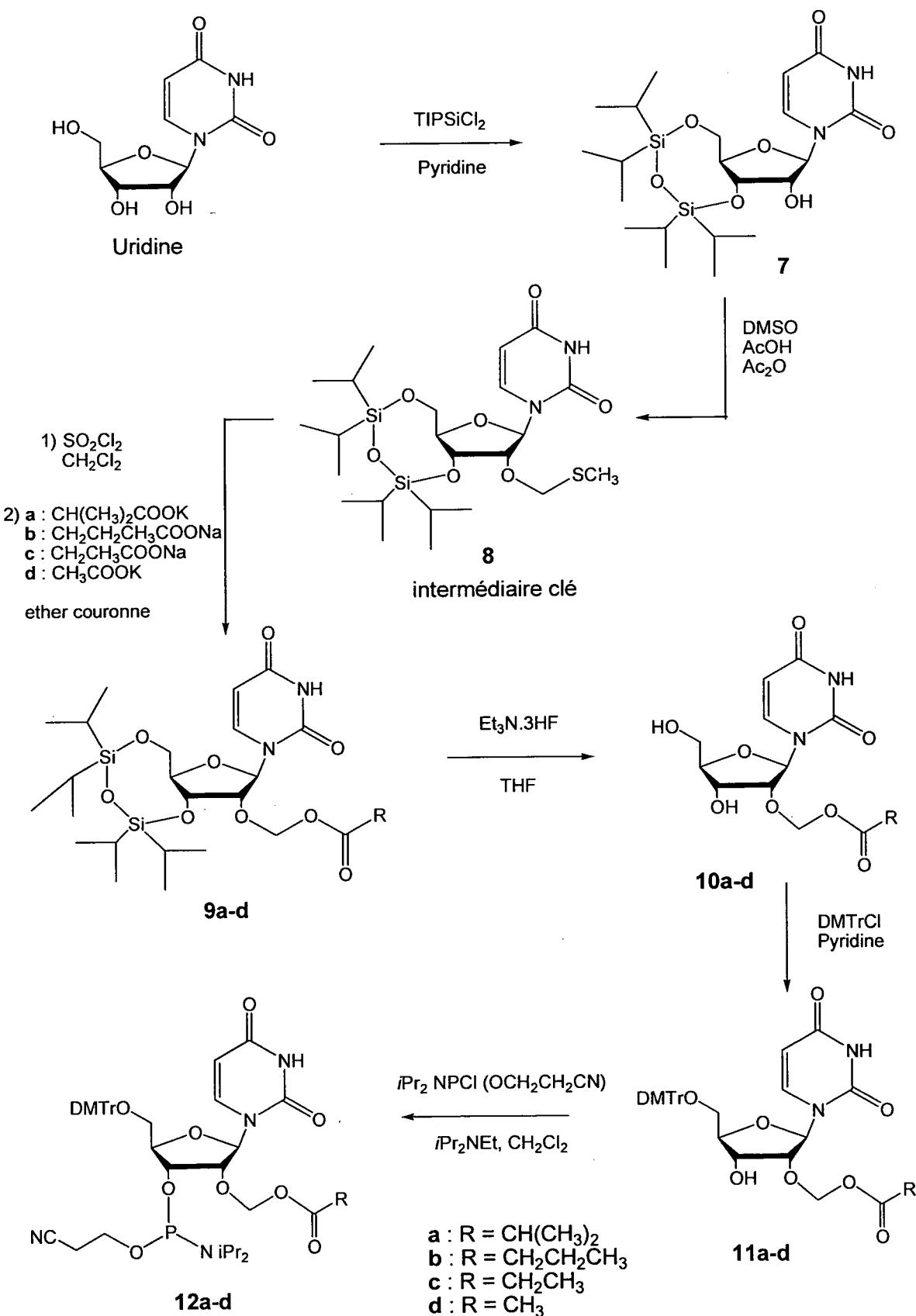
[d] AY = rendement de couplage moyen par étape

20 [e] = matériau brut global (Unités D.O = densité optique) mesuré à 260 nm par absorption UV

[f] n.d = non déterminé.

**Exemple 6 : Synthèse des monomères 2'-O-acyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl) uridine-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramide 12a-d.**

Dans cet exemple, les monomères ribonucléotidiques de formule III dans lesquels la nucléobase est l'uracile, le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 5' du ribose est un groupe diméthoxytrityle et le groupe protecteur de l'hydroxyle en position 2' du ribose est soit un groupe isobutyryloxyméthyle (**composé 12a** : 2'-O-isobutyryloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramide)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine))), soit un groupe butyryloxyméthyle (**composé 12b** : 2'-O-butyryloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramide)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine, soit un groupe propionyloxyméthyle (**composé 12c** : 2'-O-propionyloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramide)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine ))), soit un groupe acétyloxyméthyle : (**composé 12d**: 2'-O-acétyloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramide)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine ont été synthétisés selon le schéma général suivant :



La première étape de cette synthèse consiste à préparer respectivement les composés **9a** à **9d** suivants :

2'-O-isobutyryloxyméthyl-3',5'-O-(tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)uridine (**9a**),

2'-O-butyryloxyméthyl-3',5'-O-(tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)uridine (**9b**),

5 2'-O-propionyloxyméthyl-3',5'-O-(tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)uridine (**9c**),

2'-O-acétyloxyméthyl-3',5'-O-(tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)uridine (**9d**).

On procède de la façon suivante :

A une solution de 2'-O-méthylthiométhyl-3',5'-O-(tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)uridine **8** (3,07g, 5,61 mmol, 1eq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) a été ajouté goutte à goutte, sous argon, une solution de chlorure de sulfuryle 1,0M dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7,0 mL, 7,0 mmol, 1,25 eq). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 2 heures. Après la fin de la réaction, le dérivé chlorométhyl éther a été obtenu sous la forme d'une mousse brune après évaporation du solvant et a été directement utilisé dans l'étape suivante.

10 A une solution du dérivé chlorométhyl éther dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) a été ajouté goutte à goutte une solution de potassium isobutyrate (1,22 g, 9,60 mmol, 1,72 eq), ou de sodium butyrate (1,06 g, 9,60 mmol, 1,72 eq) ou de sodium propionate (922 mg, 9,60 mmol, 1,72 eq), ou de potassium acétate (926 mg, 9,60 mmol, 1,72 eq) et du dibenzo éther couronne-18-6 (1,48 g, 4,17 mmol, 0,75 eq) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10mL) ou de l'éther couronne 15-5 (920 mg, 4,17 mmol, 0,75 eq), selon le cation. Après agitation à température ambiante pendant 3 heures, le mélange a été dilué avec de l'acétate d'éthyle et lavé avec de l'eau. Une extraction avec de l'AcOEt a été mise en œuvre et l'extrait a été séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après concentration du solvant, le précipité éther couronne (seulement le dibenzo éther couronne 18-6) a été éliminé par filtration et le filtrat a été évaporé. Le mélange réactionnel a été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient d'AcOEt (0-50%) dans du cyclohexane. Les composés voulus **9a**, **9b**, **9c** et **9d** ont été obtenus sous forme de mousses blanches après évaporation du solvant.

5      **9a.** (2,30 g, 70%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, HH-COSY,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8,81 (s, 1H, NH) ; 7,80  
       (d,  $J_{\text{H-6/H-5}} = 8,1$  Hz, 1H, H-6) ; 5,70 (s, 1H, H-1') ; 5,62 (d,  $J_{\text{H-5/H-6}} = 8,1$  Hz, 1H, H-  
       5) ; 5,45 (2d<sub>AB</sub>,  $J_{\text{AB}} = 6,5$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 4,25-4,14 (m, 3H, H-2', H-3', H-5a') ;  
       4,06 (dd,  $J = 1,8$  Hz,  $J = 9,5$  Hz, 1H, H-4') ; 3,90 (dd,  $J_{\text{H5'b/H4'}} = 2,4$  Hz,  $J = 13,6$  Hz,  
       1H, H-5'b) ; 2,54 (hept,  $J = 7,0$  Hz, 1H, C(O)CH) ; 1,18-0,83 (m, 22H, iPr).  
     RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 176,6 (OC=O) ; 163,6 (C=O) ; 149,6 (C=O) ; 139,4  
       (C-6) ; 101,6 (C-5) ; 89,1 (C-1') ; 87,6 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 81,7 (C-4') ; 81,3 (C-2') ; 67,8 (C-  
       3') ; 59,3 (C-5') ; 33,9 (C(O)CH) ; 18,8-18,7-17,5-17,6-17,4-17,3-17,2-17,1-16,9-  
       16,8 ( $\text{CH}_3$ , iPr) ; 13,4-13,2-13,1-12,9-12,5 (CH, iPr).

10

10     **9b.** (2,90 g, 89%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, HH-COSY,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8,80 (s, 1H, NH) ; 7,79  
       (d,  $J_{\text{H-6/H-5}} = 8,1$  Hz, 1H, H-6) ; 5,66 (s, 1H, H-1') ; 5,61 (dd,  $J_{\text{H-5/H-6}} = 8,1$  Hz,  $J_{\text{H-5/NH}} = 2,1$  Hz, 1H, H-5) ; 5,46 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 4,19-4,13 (m, 3H, H-2', H-3', H-5a') ;  
       4,06 (dd,  $J_{\text{H-4'/H-5'b}} = 1,8$  Hz,  $J = 9,2$  Hz, 1H, H-4') ; 3,90 (dd,  $J_{\text{H-5'b/H-4'}} = 2,3$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, 1H, H-5'b) ; 2,28 (td,  $J = 7,4$  Hz,  $J = 1,3$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>) ; 1,60 (sext,  $J = 7,4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2\beta}$ ) ; 1,03-0,92 (m, 28H, iPr) ; 0,89 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_{3\gamma}$ ).  
     RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 173,2 (OC=O) ; 163,3 (C=O) ; 149,7 (C=O) ; 139,4  
       (C-6) ; 101,6 (C-5) ; 89,2 (C-1') ; 87,5 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 81,7 (C-4') ; 81,3 (C-2') ; 67,8 (C-  
       3') ; 59,3 (C-5') ; 36,1 (C(O)CH<sub>2</sub>) ; 18,1 ( $\text{CH}_{2\beta}$ ) ; 17,5-17,4-17,3-17,2-17,1-17,.0-  
       16,9-13,6-13,4-13,0-12,9-12,5 (iPr, TIPS and  $\text{CH}_{3\gamma}$ ).

20

20     **9c.** (2,37 g, 77%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, HH-COSY,  $\text{CDCl}_3$ ) : 9,18 (s, 1H, NH) ; 7,80  
       (d,  $J_{\text{H-6/H-5}} = 8,2$  Hz, 1H, H-6) ; 5,67 (s, 1H, H-1') ; 5,61 (dd,  $J_{\text{H-5/H-6}} = 8,1$  Hz,  $J_{\text{H-5/NH}} = 1,6$  Hz, 1H, H-5) ; 5,45 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 4,20-4,13 (m, 3H, H-2', H-3', H-5a') ;  
       4,06 (dd,  $J_{\text{H-4'/H-5'b}} = 1,7$  Hz,  $J = 9$  Hz, 1H, H-4') ; 3,90 (dd,  $J_{\text{H-5'b/H-4'}} = 2,1$  Hz,  $J = 13,6$  Hz, 1H, H-5'b) ; 2,34 (q,  $J = 7,6$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>) ; 1,08 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_{3\beta}$ ) ; 1,3-0,88 (m, 28H, iPr).  
     RMN  $^{13}\text{C}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 174,0 (OC=O) ; 163,6 (C=O) ; 149,8 (C=O) ; 139,3  
       (C-6) ; 101,6 (C-5) ; 89,2 (C-1') ; 87,5 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ; 81,7 (C-4') ; 81,3 (C-2') ; 67,7 (C-  
       3') ; 59,3 (C-5') ; 27,5 (C(O)C <sub>$\alpha$</sub> ) ; 17,5-17,4-17,3-17,2-17,1-17,.0-16,8-13,4-13,0-  
       12,9-12,5 (iPr, TIPS) ; 8,8 ( $\text{CH}_{3\beta}$ ).

**9d.** L'identification de ce composé est identique à celle décrite pour le même composé dans Parey et al, "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA, Organic Letters", 2006, Vol.8, No.17, 3869-3872.

5 Puis les composés 2'-O-isobutyryloxyméthyl-uridine **10a**, 2'-O-butyryloxyméthyl-uridine **10b**, 2'-O-propionyloxyméthyl-uridine **10c** and 2'-O-acétyloxyméthyl-uridine **10d** ont été synthétisés de la manière suivante :

10 A une solution de **9a** (2,30 g, 3,92 mmol, 1 eq) ou **9b** (2,90 g, 4,94 mmol, 1 eq) ou **9c** (2,37 g, 4,41 mmol, 1 eq) ou **9d** (2,90 g, 5,19 mmol, 1 eq), une solution d'Et<sub>3</sub>N.3HF (pour **9a** : 767 µL, 15,68 mmol, 4 eq; pour **9b** : 970 µL, 19,80 mmol, 4 eq; pour **9c** : 865 µL, 17,64 mmol, 4, eq et pour **9d** : 1017 µL, 20,76 mmol, 4 eq) a été ajoutée. Après agitation entre 1h30 à 5h à température ambiante, la déprotection était complète et le mélange réactionnel a été traité avec un tampon triéthylammoniumacétate (2M, pH 7), puis évaporé. Le mélange brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient de MeOH (0-4,5%) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les composés voulus **10a** à **10d** ont été obtenus sous forme de poudres blanches après une lyophilisation avec du dioxane.

15 **10a.** (1,25 g, 93%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, DMSO): 11,38 (s, 1H, NH) ; 7,2 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8,2 Hz, 1H, H-6) ; 5,89 (d, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 5,4 Hz, 1H, H-1') ; 5,68 (d, J<sub>H-5/H-6</sub> = 8,0 Hz, 1H, H-5) ; 5,37, 5.,3 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 6,5 Hz 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 5,32 (s, 1H, OH-3') ; 5,20 (s, 1H, OH-5') ; 4,26 (t, J = 5,2 Hz, 1H, H-2') ; 4,14 (s, 1H, H-3') ; 3,88 (dd, J<sub>H-4'/H-5'b</sub> = 3,0 Hz, J = 6,9 Hz, 1H, H-4'); 3,65 (dd, J<sub>H-5'a/H-4'</sub> = 2,3 Hz, J<sub>H-5'a/H-5'b</sub> = 11,9 Hz, 1H, H-5'a) ; 3,57 (dd, J<sub>H-5'b/H-4'</sub> = 2,5 Hz, J<sub>H-5'b/H-5'a</sub> = 11,8 Hz, 1H, H-5'b) ; 2,50 (hept, J<sub>CH/CH3</sub>= 7,0 Hz, 1H, C(O)CH) ; 1,07 (d, J<sub>CH3/CH</sub> = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,06 (d, J<sub>CH3/CH</sub> = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

20 RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) : 176,0 (OC=O) ; 163,5 (C=O) ; 151,0 (C=O) ; 140,9 (C-6) ; 102,4 (C-5) ; 88,0 (OCH<sub>2</sub>O) ; 86,4 (C-1') ; 85,6 (C-4') ; 81,1 (C-2') ; 69,1 (C-3') ; 61,1 (C-5') ; 33,7 (C(O)CH) 18,9 (CH<sub>3</sub>, 2C).

25 **10b.** (1,56 g, 92%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, DMSO): 11,42 (s, 1H, NH) ; 7,92 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8,1 Hz, 1H, H-6) ; 5,94 (d, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 5,5 Hz, 1H, H-1') ; 5,73 (d, J

$J_{H-5/H-6} = 8,1$  Hz, 1H,  $H-5$ ) ; 5,42, 5,25 (2d<sub>AB</sub>,  $J_{AB} = 6,5$  Hz 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 5,35 (s, 1H, OH-3') ; 5,22 (s, 1H, OH-5') ; 4,30 (t,  $J_{H-2'/H-3'} = 5,3$  Hz, 1H,  $H-2'$ ) ; 4,19 (dd,  $J_{H-3'/H-2'} = 5,2$  Hz,  $J_{H-3'/H-4'} = 9,3$  Hz, 1H,  $H-3'$ ) ; 3,93 (dd,  $J_{H-4'/H-5'b} = 3,1$  Hz,  $J = 6,8$  Hz, 1H,  $H-4'$ ) ; 3,70 (d,  $J_{H-5'a/H-5'b} = 12,0$  Hz, 1H,  $H-5'a$ ) ; 3,62 (d,  $J_{H-5'b/H-5'a} = 12,0$  Hz, 1H,  $H-5'b$ ) ; 2,30 (t,  $J_{CH2\alpha/CH2\beta} = 7,3$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub><sub>\alpha</sub>) ; 1,56 (sext,  $J_{CH2\beta/CH2\alpha} = J_{CH2\beta/CH3\gamma} = 7,4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub><sub>\beta</sub>), 0,91 (t,  $J_{CH3\gamma/CH2\beta} = 7,4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).  
 RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) : 172,2 (OC=O) ; 163,0 (C=O) ; 151,0 (C=O) ; 140,4 (C-6) ; 101,9 (C-5) ; 87,5 (OCH<sub>2</sub>O) ; 86,0 (C-1') ; 85,1 (C-4') ; 80,7 (C-2') ; 68,7 (C-3') ; 60,6 (C-5') ; 35,3 (C(O)CH<sub>2</sub><sub>\alpha</sub>) ; 17,6 (CH<sub>2</sub><sub>\beta</sub>) ; 13,3 (CH<sub>3\gamma</sub>).

10

**10c.** (1,25 g, 86%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, DMSO): 11,39 (s, 1H, NH) ; 7,93 (d,  $J_{H-6/H-5} = 8,1$  Hz, 1H,  $H-6$ ) ; 5,89 (d,  $J_{H-1'/H-2'} = 3,3$  Hz, 1H,  $H-1'$ ) ; 5,69 (d,  $J_{H-5/H-6} = 8,1$  Hz, 1H,  $H-5$ ) ; 5,36, 5,23 (2d<sub>AB</sub>,  $J_{AB} = 6,5$  Hz 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 4,25 (t,  $J_{H-2'/H-3'} = 5,2$  Hz, 1H,  $H-2'$ ) ; 4,14 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H,  $H-3'$ ) ; 3,88 (dd,  $J_{H-4'/H-5'b} = 3,0$  Hz,  $J = 7,0$  Hz, 1H,  $H-4'$ ) ; 3,68-3,56 (m, 2H,  $H-5'a$  ;  $H-5'b$ ) ; 2,30 (q,  $J_{CH2\alpha/CH3\beta} = 7,5$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub><sub>\alpha</sub>) ; 1,01 (t,  $J_{CH3\beta/CH2} = 7,5$  Hz, 3H, CH<sub>3\beta</sub>)  
 NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) : 173,0 (OC=O) ; 163,0 (C=O) ; 151,5 (C=O) ; 140,4 (C-6) ; 101,9 (C-5) ; 87,7 (OCH<sub>2</sub>O) ; 86,1 (C-1') ; 85,0 (C-4') ; 80,8 (C-2') ; 68,6 (C-3') ; 60,5 (C-5') ; 26,8 (C(O)CH<sub>2</sub><sub>\alpha</sub>) ; 8,6 (CH<sub>3\beta</sub>).

20

**10d.** L'identification de ce composé est identique à celle décrite pour le même composé dans Parey et al, "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA", Organic Letters, 2006, Vol.8, No.17, 3869-3872.

25

Ensuite, les composés **11a** à **11d** suivants ont été synthétisés :

2'-O-isobutyryloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **11a**,  
 2'-O-butyryloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **11b**,  
 2'-O-propionyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **11c**  
 et 2'-O-acétyloxyméthyl-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **11d**.  
 Pour cela, les composés **10a** (1,25 g, 3,64 mmol, 1 eq), **10b** (1,46 g, 4,25 mmol, 1, eq), **10c** (1,15 g, 3,49 mmol, 1 eq) et **10d** (1,51 g, 4,77 mmol, 1

eq) ont été séchés par trois coévaporations avec de la pyridine anhydre. Puis les solutions de **10a** à **10d** dans de la pyridine anhydre (20 mL) ont été traitées avec du chlorure de diméthoxytrityle (1,2 eq) ajouté en petites portions en 15 minutes. Les réactions ont été agitées pendant 2 à 4 heures à température ambiante sous 5 argon. A la fin de la réaction, les mélanges ont été concentrés et du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a été ajouté. Les solutions ont été versées dans une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée. Des extractions avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ont été effectuées et les extraits ont été séchés sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les mélanges obtenus après élimination du solvant ont été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80-10) dans du cyclohexane avec 1% de pyridine, puis de MeOH (0-1%) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec 1% de pyridine. Les composés **11a** à **11d** voulus ont été obtenus 10 sous la forme de mousses blanches après évaporation du solvant.

**11a.** (1,89 g, 79%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>) : 9,40 (s, 1H, NH) ; 15 7,93 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8,2 Hz, 1H, H-6) ; 7,32-7,08 (m, 10H, H<sub>ar</sub>) ; 6,79-6,75 (m, 3H, H<sub>ar</sub>) ; 5,88 (d, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 1,8 Hz, 1H, H-1') ; 5,50, 5,38 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 6,3 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 5,23 (d, J<sub>H-5/H-6</sub> = 8,6 Hz, 1H, H-5) ; 4,39 (m, 1H, H-3') ; 4,25 (dd, J<sub>H-2'/H-1'</sub> = 1,8 Hz, J<sub>H-2'/H-3'</sub> = 5,2 Hz, 1H, H-2') ; 3,95 (td, J<sub>H-4'/H-5'a</sub> = J<sub>H-4'/H-5'b</sub> = 2,1 Hz, J<sub>H-4'/H-3'</sub> = 7,6 Hz, 1H, H-4') ; 3,72, 3,71 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>) ; 3,46 (m, 2H, H-5'a, H-5'b) ; 20 2,52 (hept, J<sub>CH/(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> = 7,0 Hz, 1H, C(O)CH) ; 1,11 (2d, J<sub>CH<sub>3</sub>/CH</sub> = 7,0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>) RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 176,6 (OC=O) ; 163,4, 150,3 (C=O) ; 158,8-158,7-144,3-135,2-135,0 (Cq arom.) ; 139,7 (C-6) ; 130,2-130,1-129,2-129,0-128,2-128,1-128,0-127,2-125,3-123,8-113,3-113,1 (CH arom.) ; 102,2 (C-5) ; 88,2 (C-1') ; 87,7 (OCH<sub>2</sub>O) ; 87,1 (OCq, DMTr) ; 83,2 (C-4') ; 82,1 (C-2') ; 68,5 (C-3') ; 61,2 25 (C-5') ; 55,3 (OCH<sub>3</sub>, DMTr) ; 34,0 (C(O)CH) ; 17,8 (CH<sub>3</sub>, iPr).

**11b.** (2,26 g, 79%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>) : 9,20 (s, 1H, NH) ; 7,91 (d, J<sub>H-6/H-5</sub> = 8,2 Hz, 1H, H-6) ; 7,33-7,14 (m, 10H, H<sub>ar</sub>) ; 6,79-6,75 (m, 3H, H<sub>ar</sub>) ; 5,88 (d, J<sub>H-1'/H-2'</sub> = 1,8 Hz, 1H, H-1') ; 5,48, 5,38 (2d<sub>AB</sub>, J<sub>AB</sub> = 6,3 Hz 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 5,23 (dd, J<sub>H-5/NH</sub> = 1,9 Hz, J<sub>H-5/H-6</sub> = 8,2 Hz, 1H, H-5) ; 4,43-4,37 (m, 1H, H-3') ; 4,26-4,24 (m, 1H, H-2') ; 3,72, 3,71 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>) ; 3,96-3,94 (m, 1H, H-4') ; 3,50-3,42 (m, 2H, H-5'a, H-5'b) ; 2,47 (d, J<sub>OH-3'/H-3'</sub> = 8,9 Hz, 1H, OH-3') ; 2,27 (t,

$J = 7,5$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub> $\alpha$ ) ; 1.58 (sext,  $J_{\text{CH}_2\beta/\text{CH}_2\alpha} = J_{\text{CH}_2\beta/\text{CH}_3\gamma} = 7.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> $\beta$ ); 0,88.(t,  $J_{\text{CH}_3\gamma/\text{CH}_2\beta} = 7.5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> $\gamma$ ).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173,1 (OC=O) ; 163,2, 150,2 (C=O) ; 158,8-158,7-144,3-135,2-135,0 (Cq arom.) ; 139,8 (C-6) ; 130,2-130,1-129,1-129,0-128,1-128,0-127,8-127,2-113,3-113,2-113,1 (CH arom.) ; 102,2 (C-5) ; 88,1 (C-1') ; 87,7 (OCH<sub>2</sub>O) ; 87,1 (OCq, DMTr) ; 83,2 (C-4') ; 82,0 (C-2') ; 68,6 (C-3') ; 61,2 (C-5') ; 55,3 (OCH<sub>3</sub>, DMTr) ; 36,1 (C(O)CH<sub>2</sub>) ; 18,1 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ) ; 13,6 (CH<sub>3</sub> $\gamma$ ).

**11c.** (1,81 g, 82%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, HH-COSY, CDCl<sub>3</sub>) : 9,27 (s, 1H, NH) ;

7,91 (d,  $J_{\text{H-6/H-5}} = 8,1$  Hz, 1H, H-6) ; 7,31-7,08 (m, 10H, H<sub>ar</sub>) ; 6,78-6,74 (m, 3H, H<sub>ar</sub>) ; 5,88 (d,  $J_{\text{H-1'/H-2'}} = 1,7$  Hz, 1H, H-1') ; 5,47, 5,39 (2d<sub>AB</sub>,  $J_{\text{AB}} = 6,4$  Hz 2H, OCH<sub>2</sub>O) ; 5,22 (dd,  $J_{\text{H-5/NH}} = 1,0$  Hz,  $J_{\text{H-5/H-6}} = 8,1$  Hz, 1H, H-5) ; 4,43-4,37 (m, 1H, H-3') ; 4,25 (m, 1H, H-2') ; 3,95 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, H-4') ; 3,72, 3,71 (2s, 6H, OCH<sub>3</sub>) ; 3,47-3,42 (m, 2H, H-5'a, H-5'b) ; 2,48 (d,  $J_{\text{OH-3'/H-3'}} = 8,5$  Hz, 1H, OH-3') ; 2,31 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H, C(O)CH<sub>2</sub> $\alpha$ ) ; 1,07 (t,  $J_{\text{CH}_3\beta/\text{CH}_2\alpha} = 7,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> $\beta$ ).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174,0 (OC=O) ; 163,4, 150,2 (C=O) ; 158,7-144,3-141,5-135,3-135,0 (Cq arom.) ; 139,9 (C-6) ; 130,2-130,1-129,1-128,1-128,0-127,8-127,7-127,2-127,1-113,3-113,2 (CH arom.) ; 102,2 (C-5) ; 88,1 (C-1') ; 87,8 (OCH<sub>2</sub>O) ; 87,1 (OCq, DMTr) ; 83,2 (C-4') ; 82,0 (C-2') ; 68,6 (C-3') ; 61,2 (C-5') ; 55,3 (2C, OCH<sub>3</sub>, DMTr) ; 27,5 (C(O)CH<sub>2</sub>) ; 8,8 (CH<sub>3</sub> $\beta$ ).

**11d.** L'identification de ce composé est identique à celle décrite pour le même composé dans Parey et al, "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA, Organic Letters", 2006, Vol.8, No.17,

25 3869-3872.

Enfin, les monomères de formule III ont été synthétisés.

2'-O-isobutyryloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl N,N-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **12a**, 2'-O-butyryloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **12b**, 2'-O-propionyloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **12c** et 2'-O-

acétyloxyméthyl-3'-O-(2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)uridine **12d**.

Pour cela, les composés **11a** (1,77 g, 2,74 mmol, 1 eq), **11b** (2,17 g, 3,36 mmol, **11c** (1,80 g, 2,85 mmol) et **11d** (1,65 g, 2,67 mmol) ont été séchés par trois coévaporations avec du CH<sub>3</sub>CN anhydre. Puis, le résidu a été dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (14 mL) et un mélange de *N,N*-diisopropyléthylamine (pour **11a** : 859 µL, 4,93 mmol, 1,8 eq; pour **11b** : 1050 µL, 6,06 mmol, 1,8 eq; pour **11c** : 894 µL, 5,13 mmol, 1,8 eq; et pour **11d** : 838 µL, 4,81 mmol, 1,8 eq), et de 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (pour **11a** : 917 µL, 4,11 mmol, 1,5 eq; pour **11b** : 1120 µL, 5,04 mmol, 1,5 eq; pour **11c** : 954 µL, 4,28 mmol, 1,5 eq; pour **11d** : 895 µL, 4,01 mmol, 1,5 eq) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) a été ajouté goutte à goutte. Le mélange a été agité sous argon, à température ambiante, pendant 3 heures. Après la fin de la réaction, de l'acétate d'éthyle a été ajouté, le mélange réactionnel a été versé dans une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée et des extractions avec de l'AcOEt ont été mises en œuvre. Le mélange, obtenu après séchage de l'extrait sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et élimination du solvant a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50-100%) dans du cyclohexane avec 1% de pyridine. Les phosphoramidites voulus **12a** à **12d** ont été obtenus sous la forme de mousses blanches après évaporation du solvant.

**12a.** (1.63 g, 70%). RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ (ppm): 150.35, 149.15.

**12b.** (1.85 g, 66%). Rmn <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ (ppm): 150.31, 149.09.

**12c.** (1.93 g, 81%). RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ (ppm): 150.30, 149.01.

**12d.** (1.14 g, 52%). RMN <sup>31</sup>P (121 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ (ppm): 150.31, 148.96.

25

**Exemple 7 : Synthèse d'ARN simple brin de formule I par la chimie des phosphoramidites avec X<sub>3</sub> qui est un groupe isobutyloxyméthyle ou un groupe butyroxyméthyle ou un groupe propionyloxyméthyle ou un groupe acétyloxyméthyle.**

30 A partir des monomères obtenus **12a-d** à l'exemple 6, des ARN simple brin ont été synthétisés.

Ces ARN protégés de formule I ont été préparés selon le procédé identique à celui décrit dans l'exemple 5 pour l'obtention des ON4 à ON5. Les ARN notés ON6 à ON9 de séquence identique U<sub>19</sub>TT ont été obtenus avec les résultats montrés au tableau 3 suivant :

ON <sup>[a]</sup> U <sub>19</sub> TT	X <sub>3</sub>	CT <sup>[b]</sup>	OY <sup>[c]</sup>	AY <sup>[d]</sup>	Matériau brut <sup>[e]</sup>
6	isobutyryloxyméthyle	180	75.9	98.5	122
7	Butyryloxyméthyle	180	68.4	98.1	130
8	Propionyloxyméthyle	180	77.9	98.7	100
9	Acétyloxyméthyle	180	70.7	98.3	120

5

Tableau 3

[a] ON = oligoribonucléotides

[b] = temps de couplage (s) dans le cycle de synthèse automatisé

[c] OY = rendement global de couplage (%)

10 [d] AY = rendement de couplage moyen par étape

[e] = matériau brut global (Unités D.O = densité optique) mesuré à 260 nm par absorption UV

Il est à noter que les groupes X<sub>3</sub> isobutyryloxyméthyle et butyryloxyméthyle ont été enlevés de l'ARN de formule I en 15 min par le traitement à l'ammoniaque concentré et les groupes X<sub>3</sub> propionyloxyméthyle et acétyloxyméthyle ont été enlevés en moins de 5 min par le traitement à l'ammoniaque concentré même si ce traitement a été prolongé jusqu'à 1h30 pour rompre complètement le lien succinyle avec le support solide et libérer les ARN.

20

#### Exemple 8 : Digestion enzymatique d'ARN

Les ARN ON4 et ON5 obtenus à l'exemple 5 (2 unités de DO à 260 nm) ont été incubés avec une nucléase P1 (0,25 unités) (spécifique des coupures de liaisons internucléosidiques 3'-5') à 37°C pendant 48h.

25

Puis, une phosphatase alcaline (2,5 unités) et un tampon (50 mM Tris-HCl, pH 9,3, contenant 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de ZnCl<sub>2</sub> et 1 mM de

spermidine; concentrations finales) ont été ajoutés pour donner un volume total de 115 µl et le mélange a été incubé à 37°C pendant 24h supplémentaires. Le mélange réactionnel a été analysé par HPLC.

Les ARN ont été complètement dégradés pour donner les quatre 5 ribonucléosides naturels ce qui prouve l'intégrité des liaisons internucléotidiques 3'-5'. Aucune liaison non naturelle 2'-5' n'a été détectée.

**Exemple 9 : Test *in vitro* d'un siARN obtenu par le procédé de l'invention**

10 L'activité du duplex siARN obtenu à partir des ARN simple brin ON4 et ON5 hybridés ensemble a été évaluée dans un test ARN interférence qui cible l'ARN messager de l'oncogène Ret/PTC1 impliqué dans le cancer papillaire de la thyroïde.

15 Cette activité du duplex siARN ON4/ON5 obtenu par la méthode de l'invention a été comparée à l'activité du même duplex siARN AS fourni par Eurogentec et synthétisé par une autre voie de synthèse (méthode 2'-TBDMS).

20 Les cellules utilisées pour tester le siARN obtenu étaient des fibroblastes murins NIH/3T3 transfectés de façon stable par un vecteur pBAB exprimant l'oncogène humain Ret/PTC1. La culture de cellules a été effectuée dans un milieu DMEM (GIBCO) contenant 10% de sérum bovin de nouveau né inactivé par la chaleur (10%, GIBCO), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml, GIBCO), et de la puromycine (2,5 µg/ml Sigma) à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans une atmosphère humide.

25 Cette culture de cellules a été ensuite traitée avec le siARN obtenu à partir des ARN simple brin ON4 et ON5 ainsi qu'avec le siARN AS commercial.

30 Un jour avant le traitement, 3.10<sup>5</sup> cellules ont été ensemencées sur des plaques à six trous. Une transfection a été effectuée en mélangeant 0,05 nmol de siARN dans 50 µl de tampon Hepes 10 mM, pH 7,2, 100 mM de NaCl avec 2 µg de cytofectine (GTS) dans 50 µl du même tampon. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les complexes ont été ajoutés aux cellules dans 900 µl de milieu de culture frais contenant du sérum pendant 24h.

L'expérience a été effectuée en triple. Les séquences de contrôle du siARN sont SEQ ID NO: 6 : 5'-GCCAGUGUCACCGUCAAGGdAdG-3' et SEQ ID NO: 7 : 5'-CCUUGACGGUGACACUGGCdTdT-3' et ont été fournies par Eurogentec. Ce sont des séquences aléatoires non spécifiques de l'ARNm visé.

5 Puis, la détection de l'expression de l'ARNm Ret/PTC1 a été effectuée par RT-PCR. L'extraction de l'ARNm a été effectuée avec le réactif TRIzol (Invitrogen) comme indiqué par le fabricant. Après détermination de la concentration par spectrométrie UV, 1 µg de l'ARN total provenant soit des cellules de contrôle, soit des cellules traitées ont été incubés avec Mo-MuLV RT  
10 (Promega), comme indiqué par le fabricant, dans 20 µl de volume final pendant 1h à 42°C. Puis l'expression de l'ARNm Ret/PTC1 a été déterminée par PCR sur 2 µl de produits de transcription inverse dans 50 µl de milieu réactionnel comprenant la Taq Polymerase (Ozyme).

Les amores suivantes ont été utilisées pour l'amplification de  
15 Ret/PTC1 (290 pb) amorce antisens : SEQ ID NO: 8 : 5'-  
CTGCTTCAGGACGTTGAA-3' et amorce sens SEQ ID NO: 9 : 5'-  
AGATAGAGCTGGAGACCTAC-3'.

Le GAPDH (531 pb), gène codant pour l'enzyme glyceraldehyde  
3-phosphate deshydrogenase, a été utilisé comme contrôle du fonctionnement de  
20 la transcription inverse (RT) avec les séquences amores SEQ ID NO :10 : 5'-  
GACAACACTCAAGATTGTCAG-3' et SEQ ID NO :11 : 5'-  
CATTGTCATACCAGGAAATG-3'.

Les produits de PCR ont été obtenus après 21 ou 32 cycles,  
respectivement, et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% avec un  
25 tampon Tris Acétate EDTA (TAE) [0,5x]. Les fragments d'ADN ont été détectés  
sous illumination UV après coloration avec du bromure d'éthydium et ensuite une  
quantification a été effectuée avec un système d'analyse par ordinateur couplé à  
une caméra (Syngene). Les expériences ont été effectuées en triple.

Ces différentes expériences (faites en triple) ont montré que le  
30 siARN double brin obtenu à partir des ARN ON4 et ON5, eux-mêmes obtenus par  
la méthode de l'invention avait une meilleure activité pour rendre silencieux le  
gène (60% d'inhibition) que le siARN AS double brin de même séquence acheté et

fabriqué par la méthode chimique de protection avec le TBDMS (40% d'inhibition). Cette meilleure activité pourrait être expliquée par une pureté plus élevée de l'ARN double brin de l'invention purifié par RP-HPLC en comparaison au siARN AS purifié par PAGE.

5                 Dans tous les cas, ce résultat confirme l'intégrité et la pureté des ARN synthétisés par la méthode de l'invention.

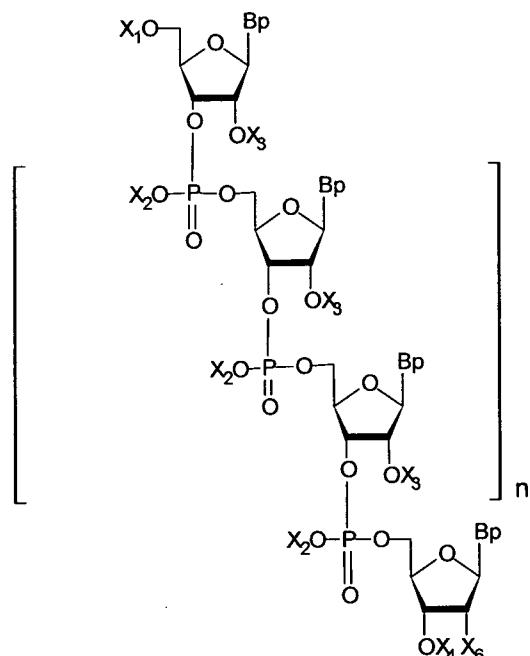
Il apparaîtra clairement à l'homme de l'art que tout autre groupement protecteur des nucléobases, et des hydroxyles en position 3' et 5' du ribose bien connus, peuvent être utilisés, à condition que le groupement protecteur de l'hydroxyle en position 3' soit baso-labile de type acyloxyalkyle ou acylthioalkyle.

10                 De plus, il apparaîtra clairement à l'homme du métier que le traitement avec l'ammoniaque utilisé pour déprotéger l'hydroxyle en position 2' et les fonctions amines exocycliques des nucléobases de l'ARN synthétisé permet 15 également, et en même temps, de libérer l'ARN de son support solide, lorsqu'il est lié au support solide par un lien baso-labile tel qu'un lien succinyle ou Q-linker.

20                 De plus, bien que dans la description qui précède et les revendications annexées, le groupe protecteur X<sub>1</sub> ait été décrit comme étant choisi parmi des groupes acido-labiles, il apparaîtra clairement à l'homme de l'art que des groupes fluor-labiles ou baso-labiles appropriés connus de l'homme du métier pourront également être utilisés pour protéger l'hydroxyle en position 5' du ribose.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de libération d'un ARN simple brin à partir d'un ARN simple brin, protégé et lié par un lien à un support solide, de formule I suivante :



5

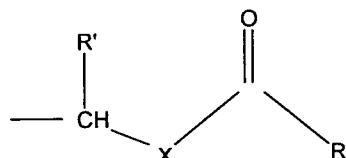
Formule I

dans laquelle :

-  $X_1$  est H ou un groupe protecteur d'hydroxyle choisi parmi un groupe diméthoxytrityle, un groupe monométhoxytrityle et un groupe pixyle, de préférence un groupe diméthoxytrityle,

-  $X_2$  est H ou un groupe protecteur du phosphate  $\beta$ -éliminable, de préférence un groupe cyanoéthyle,

-  $X_3$  est un groupe baso-labile protecteur des hydroxydes en position 2' du ribose de formule A suivante :



15

Formule A

dans laquelle X est O ou S, R' est H ou  $\text{CH}_3$ , et R est choisi parmi un groupe alkyle en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $\text{R}_1\text{-O-}\text{R}_2$  dans lequel

R<sub>1</sub> est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>2</sub> et R<sub>2</sub> est un groupe CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> ou aryle,

- X<sub>4</sub> représente l'ensemble lien-support,
- X<sub>6</sub> est H ou un groupe OX<sub>3</sub> ou OAc,

5                   Bp est une nucléobase thymine naturelle ou modifiée lorsque X<sub>6</sub> est H ou uracile naturelle ou modifiée lorsque X<sub>6</sub> est OX<sub>3</sub> ou OAc, ou adénine naturelle ou modifiée protégée, ou cytosine naturelle ou modifiée protégée, ou guanine naturelle ou modifiée protégée quelque soit X<sub>6</sub>, et

- n est un entier supérieur ou égal à 0,

10                  caractérisé en ce qu'il comprend une étape a) de traitement de l'ARN simple brin protégé lié à un support de formule I avec une base choisie parmi la pipéridine, la 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU), la triéthylamine, à température ambiante, pour libérer le phosphate des liens internucléosidiques 3'-5', lorsque X<sub>2</sub> est différent de H, suivie d'une étape b) de traitement de l'ARN 15 partiellement libéré obtenu à l'étape a), avec une base choisie parmi l'ammoniaque concentré, la méthylamine, le carbonate de potassium, à température ambiante.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que, dans la formule I, X<sub>3</sub> est un groupe de formule A.

20                  3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, dans la formule I, X<sub>3</sub> est un groupe pivaloyloxyméthyle, ou un groupe isobutyryloxyméthyle, ou un groupe butyryloxyméthyle ou un groupe propionyloxyméthyle, ou un groupe acétyloxyméthyle.

25                  4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que, dans la formule I, la nucléobase Bp est l'uracile naturelle ou modifiée.

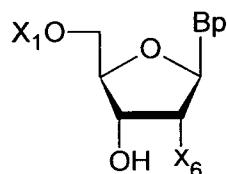
30                  5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que, dans la formule I, les quatre nucléobases uracile, adénine, cytosine et guanine, naturelles ou modifiées, sont présentes et en ce qu'à l'étape b) l'enlèvement du groupe protecteur X<sub>3</sub> est effectuée par traitement avec de l'ammoniaque, puis ajout de 15% en volume par rapport au volume total

d'ammoniaque, d'isopropylamine, puis évaporation sous pression réduite du milieu de déprotection.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'ARN, protégé et lié à un support, de formule I,  
5 est lié à un support solide par un lien baso-labile.

7. Procédé de synthèse d'un ARN simple brin caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) liaison à un support solide d'un monomère de formule II suivante

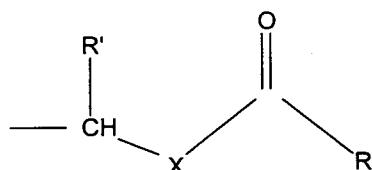


Formule II

dans laquelle :

- $X_1$  est un groupe diméthoxytrityle,
- $X_6$  est H ou un groupe OAc ou  $OX_3$  dans lequel  $X_3$  est un

15 groupe de formule A suivante :

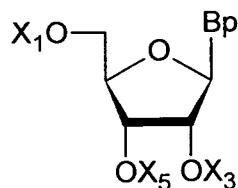


Formule A

20 dans laquelle  $X$  est O ou S,  $R'$  est H ou  $CH_3$ , et  $R$  est choisi parmi un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $R_1-O-R_2$  dans lequel  $R_1$  est un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_2$  et  $R_2$  est un groupe  $CH_3$  ou  $CH_2CH_2-O-CH_3$  ou aryle,

25 -  $Bp$  est une nucléobase thymine naturelle ou modifiée lorsque  $X_6$  est H ou une nucléobase uracile naturelle ou modifiée lorsque  $X_6$  est OAc ou  $OX_3$  ou alors une nucléobase adénine naturelle ou modifiée protégée ou une nucléobase cytosine naturelle ou modifiée protégée ou une nucléobase guanine naturelle ou modifiée protégée quelque que soit  $X_6$ ,

b) assemblage, avec le monomère de formule II lié à son support obtenu à l'étape a), d'au moins un monomère de formule III suivante :



Formule III

5 dans laquelle  $X_1$ , Bp,  $X_3$  sont tels que définis pour la formule II et  $X_5$  est un groupe hydrogénophosphonate monoester ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite, ce par quoi on obtient un ARN simple brin protégé lié à un support de formule I, et

10 c) optionnellement traitement par un milieu acide de l'assemblage obtenu à l'étape c), et

d) libération de l'ARN simple brin protégé lié à un support obtenu à l'étape b) ou à l'étape c), par le procédé de libération selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Procédé de synthèse d'un ARN simple brin selon la 15 revendication 7 caractérisé en ce qu'il comprend de plus, avant l'étape b), une étape a') de synthèse d'un monomère de formule III consistant en les étapes suivantes :

a) protection des amines exocycliques des nucléobases Bp, lorsque la nucléobase Bp est différente de l'uracile naturelle ou modifiée,

20 b) protection de l'hydroxyle en position 5' du sucre ribose,

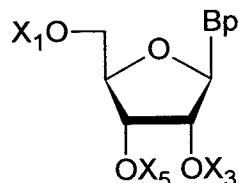
c) protection de l'hydroxyle en position 2' du sucre ribose avec un groupe de formule A, et

d) fonctionnalisation de l'hydroxyle en position 3' du sucre ribose avec un groupe hydrogénophosphonate monoester ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite.

9. Procédé de synthèse d'un ARN double brin caractérisé en ce qu'il comprend la synthèse d'un ARN simple brin selon le procédé de la revendication 7 et l'hybridation de l'ARN simple brin ainsi synthétisé avec un ARN simple brin ayant une séquence complémentaire.

10. Procédé de synthèse selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que l'ARN double brin est un siARN.

11. Procédé de synthèse d'un monomère de formule III suivante:



Formule III

5

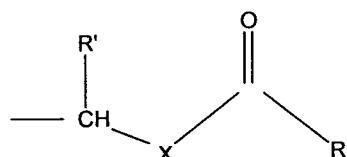
dans laquelle

-  $Bp$  est une nucléobase uracile naturelle ou modifiée ou une nucléobase adénine naturelle ou modifiée protégée ou une nucléobase cytosine naturelle ou modifiée protégée ou une nucléobase guanine naturelle ou modifiée protégée,

10

-  $X_1$  est un groupe diméthoxytrityle,

-  $X_3$  est un groupe baso-labile de formule A suivante :



Formule A

15

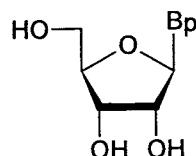
dans laquelle  $X$  est O ou S,  $R'$  est H ou  $CH_3$ , et  $R$  est choisi parmi un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_4$  linéaire ou ramifié et un groupe  $R_1-O-R_2$  dans lequel  $R_1$  est un groupe alkyle en  $C_1$  à  $C_2$  et  $R_2$  est un groupe  $CH_3$  ou  $CH_2CH_2-O-CH_3$  ou aryle,

20

-  $X_5$  est un groupe hydrogénophosphonate ou phosphoramidite,

de préférence un groupe 2-cyanoéthyl- $N,N$ -diisopropylphosphoramidite

à partir d'un monomère ribonucléoside de formule IV suivante :



Formule IV

25

dans laquelle  $Bp$  est une nucléobase naturelle ou modifiée uracile,

adénine, cytosine, ou guanine,

caractérisé en ce qu'il consiste en les étapes suivantes :

- a) protection des amines exocycliques des nucléobases Bp, lorsque la nucléobase Bp est différente de l'uracile naturelle ou modifiée,
- b) protection de l'hydroxyle en position 5' du sucre ribose,
- c) protection de l'hydroxyle en position 2' du sucre ribose avec un groupe protecteur de formule A, et
- d) fonctionnalisation de l'hydroxyle en position 3' du sucre ribose avec un groupe hydrogénophosphonate monoester ou phosphoramidite, de préférence un groupe 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite.

10 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'à l'étape c) le groupe protecteur est un groupe de formule A choisi parmi un groupe pivaloyloxyméthyle, un groupe isobutyryloxyméthyle, un groupe butyryloxyméthyle, un groupe propionyloxyméthyle, et un groupe acétyloxyméthyle.

15 13. Procédé selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce qu'à l'étape c), le groupe de formule A est un groupe pivaloyloxyméthyle.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisé en ce qu'à l'étape b), le groupe protecteur est un groupe diméthoxytrityle

20 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'à l'étape d) le groupe X<sub>5</sub> est un groupe 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite.

25 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que la nucléobase est la cytosine naturelle ou modifiée et en ce que le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe acétyle.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 caractérisé en ce que la nucléobase est l'adénine naturelle ou modifiée et en ce que le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe phénoxyacétyle.

30 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 15 caractérisé en ce que la nucléobase est la guanine naturelle ou modifiée et en ce que le groupe protecteur à l'étape a) est un groupe *tert*-butylphénoxyacétyle ou *iso*-propylphénoxyacétyle.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/000624

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H1/00 C07H19/06 C07H19/16 C07H21/02

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)

C07H

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 practical, 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.
X	PAREY, NORA ET AL: "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA" ORGANIC LETTERS , 8(17), 3869-3872 CODEN: ORLEF7; ISSN: 1523-7060, 2006, XP002494287 cited in the application the whole document -----	1-18
X	CN 1 900 103 A (ZHANG BILIANG [CN]) 24 January 2007 (2007-01-24) the whole document -----	1-18
A	HOFFMANN, REINHARD W. ET AL: "Synthesis of the trioxadecalin-part of mycalamide B" TETRAHEDRON LETTERS (1993), 34(49), 7903 -6 CODEN: TELEAY; ISSN: 0040-4039, 1993, XP002494288 -----	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "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)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "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
- "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
- "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.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 2009

Date of mailing of the international search report

13/11/2009

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

Klein, Didier

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2009/000624

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**Continuation of Box III**

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

**1. Claims: 1-10**

**Method for RNA synthesis/deprotection as per claims 1-10**

**2. Claims: 11-18**

**Method for monomer synthesis as per claims 11-18**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/FR2009/000624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 1900103	A 24-01-2007	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°  
PCT/FR2009/000624

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C07H1/00 C07H19/06 C07H19/16 C07H21/02

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)  
C07H

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
X	PAREY, NORA ET AL: "First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA" ORGANIC LETTERS , 8(17), 3869-3872 CODEN: ORLEF7; ISSN: 1523-7060, 2006, XP002494287 cité dans la demande le document en entier	1-18
X	CN 1 900 103 A (ZHANG BILIANG [CN]) 24 janvier 2007 (2007-01-24) le document en entier	1-18
A	HOFFMANN, REINHARD W. ET AL: "Synthesis of the trioxadecalain-part of mycalamide B" TETRAHEDRON LETTERS (1993), 34(49), 7903 -6 CODEN: TELEAY; ISSN: 0040-4039, 1993, XP002494288	1-18



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



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

5 novembre 2009

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/11/2009

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klein, Didier

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Demande internationale n°  
PCT/FR2009/000624**Cadre n°. II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

- 1:  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :
  
2.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :
  
3.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre n°. III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2.  Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.
  
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s : \_\_\_\_\_
  
4.  Aucunes taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s : \_\_\_\_\_

**Remarque quant à la réserve**  Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-10

Procédé de synthèse/déprotection d'un ARN selon les revendications 1-10  
---

2. revendications: 11-18

Procédé de synthèse d'un monomère selon les revendications 11-18.  
---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/000624

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 1900103	A 24-01-2007	AUCUN	