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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
6 février 2014 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/019966 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 213/80 (2006.01) *C07H 21/00* (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/065854

(22) Date de dépôt international :
26 juillet 2013 (26.07.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1257526 2 août 2012 (02.08.2012) FR

(71) Déposant : **BIOMÉRIEUX** [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs : **CAILLY, Thomas**; 80 rue du Vaugueux, F-14000 Caen (FR). **FABIS, Frédéric**; 10 Chemin du Clos de Salle, F-14920 Mathieu (FR). **LAAYOUN, Ali**; 214 Chemin du Trievoze, F-38260 La Frette (FR). **LAURENT, Alain**; 3 rue Châteaubriand, F-38100 Grenoble (FR). **URSUEGUI, Sylvain**; 5 Avenue Albert Sorel, F-14000 Caen (FR).

(74) Mandataire : **RICHAUD, Fabien**; Murgitroyd & Company, 55 Allée Pierre Ziller, CS50105, F-06902 Valbonne Sophia Antipolis (FR).

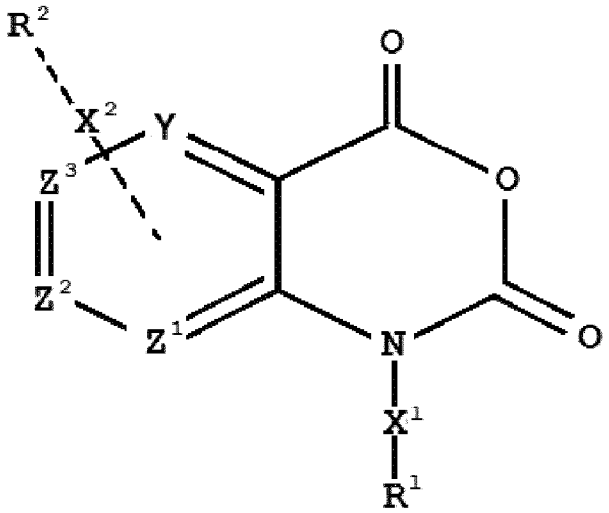
(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : FUNCTIONALISATION METHODS AND REAGENTS USED IN SUCH METHODS USING AN AZAISATOIC ANHYDRIDE OR ONE OF THE DERIVATIVES OF SAME, BIOLOGICAL MOLECULES THEREBY TREATED, AND KITS

(54) Titre : PROCEDES DE FONCTIONNALISATION ET REACTIFS UTILISES DANS DE TELS PROCEDES UTILISANT UN ANHYDRIDE AZA-ISATOÏQUE OU UN DE SES DERIVES, MOLECULES BIOLOGIQUES AINSI TRAITEES ET KITS



(57) Abstract : The present invention concerns a method for functionalising at least one ribonucleic acid (RNA) molecule, contained in a liquid sample, which comprises the following steps: a) providing at least: - one binding molecule constituted by an azaisatoic anhydride or one of the derivatives of same, - a moiety of interest, and - a binding arm connecting the binding molecule with the moiety of interest, b) causing the anhydride function of the binding molecule to react with at least one hydroxyl moiety carried: - in position 2' of the ribose of one of the RNA nucleotides, and/or - in position(s) 2' and/or 3' of the ribose of the nucleotide at terminal end 3' of the RNA, and c) obtaining an aza-anthranylate that binds the RNA to the moiety of interest via the binding arm.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2014/019966 A1

Publiée :

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

La présente invention concerne un procédé de fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), contenu dans un échantillon liquide, qui comprend les étapes suivantes: a) disposer d'au moins: - une molécule de liaison constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés, - un groupement d'intérêt, et - un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt, b) faire réagir la fonction anhydride de la molécule de liaison avec au moins un groupement hydroxyle porté: - en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou - en position(s) 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide à l'extrémité 3' terminal de l'ARN, et c) obtenir un aza-anthranylate reliant, à l'aide du bras de liaison, l'ARN au groupement d'intérêt.

PROCEDES DE FONCTIONNALISATION ET REACTIFS UTILISES DANS DE TELS PROCEDES UTILISANT UN ANHYDRIDE AZA-ISATOÏQUE OU UN DE SES DERIVES, MOLECULES BIOLOGIQUES AINSI TRAITEES ET KITS

La présente invention concerne de nouveaux procédés notamment de fonctionnalisation, de marquage, de capture ou de séparation de molécules biologiques, et plus précisément d'acides ribonucléiques (ARN) naturels ou synthétiques ou d'acides nucléiques chimèriques ADN/ARN synthétiques. Dans la suite du texte, le terme « fonctionnalisation » ou les termes apparentés (« fonctionnaliser » par exemple) seront utilisés et pourront vouloir dire aussi bien marquage par une molécule détectable, addition d'un adduit permettant la capture, la séparation ou l'inhibition de molécules biologiques. Elle concerne également des molécules biologiques ainsi traitées ou marquées, ainsi que des kits utilisables dans le domaine du diagnostic, notamment le diagnostic moléculaire, utilisant la détection et l'analyse des acides nucléiques.

L'état de la technique montre que de nombreuses méthodes existent pour fonctionnaliser avec des groupements d'intérêt, des nucléotides, des oligonucléotides ou des acides nucléiques naturels ou produits par des techniques d'amplification.

Une première méthode consiste à fixer le groupement d'intérêt sur la base, que celle-ci soit naturelle ou modifiée. Une deuxième méthode propose de fixer le groupement d'intérêt sur le sucre, là encore qu'il soit naturel ou modifié. Une troisième méthode a pour objet la fixation du groupement d'intérêt sur le phosphate.

Le groupement d'intérêt sur la base a été notamment utilisé dans l'approche de marquage des acides nucléiques par incorporation de nucléotides directement marqués.

De manière générale, la fonctionnalisation au niveau du sucre est bien plus neutre que celle réalisée sur le phosphate ou sur la base, ce qui impacte la spécificité et la sensibilité.

En fait l'homme du métier, qui doit effectuer une fonctionnalisation d'un nucléotide ou d'un analogue de nucléotide ou d'un acide nucléique, est enclin à effectuer cette fixation sur la base ou sur le sucre qui lui offrent plus de commodité et d'alternatives. C'est d'ailleurs ce qui ressort de l'étude de nombreux documents sur le marquage notamment, tels que EP-A-0.063.879, EP-A-0.097.373, EP-A-0.302.175, EP-A-0.329.198, EP-A-0.567.841, US-A-5,449,767, US-A-5,328,824, WO-A-93/16094 ou DE-A-3.910.151 pour la base ou EP-B-0.063.879 ou EP-B-0.286.898 pour le sucre.

De manière plus spécifique, la fonctionnalisation sur le sucre est souvent utilisée dans le cas des sondes nucléiques préparées par synthèse chimique. Il existe toutefois un besoin pour des groupements d'intérêt qui soient spécifiques au niveau de la position de fixation, et en particulier qui n'affectent pas les propriétés d'hybridation des bases impliquées dans la formation de la double hélice, par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes, et qui soient également spécifiques des ARN, afin de fonctionnaliser indifféremment les ribonucléotides, les oligoribonucléotides, des acides nucléiques ARN naturels ou préparés par transcription, les acides nucléiques comprenant à la fois au moins une partie ARN et au moins une partie ADN, par transcription inversée ou par amplification enzymatique.

Dans le cas du marquage et afin de rendre les cibles détectables sur les puces à ADN, il est nécessaire d'y fixer préalablement un marqueur. Il s'agit d'une étape importante, car elle seule permet de détecter la présence des acides nucléiques et d'établir un diagnostic. Il importe donc que la technologie de marquage soit extrêmement reproductible, robuste et sensible. Ceci est directement corrélé à la qualité et à l'efficacité du réactif chimique de marquage.

De plus, dans les technologies de fonctionnalisation chimique, le groupement d'intérêt ne doit pas affecter les propriétés d'hybridation des acides nucléiques.

La Demanderesse a, par le passé, déposé un certain nombre de demandes de brevet sur des molécules comprenant un composé diazo :

- brevet EP-B-1.383.732 déposé le 3 mai 2002, et délivré le 17 février 2010,
- demande EP05/739660.8 déposée le 24 mars 2005,
- demande EP08/805961.3 déposée le 9 juin 2008, et
- demande FR08/55190 déposée le 29 juillet 2008.

A titre d'information, les groupements d'intérêt à base de fonction diazo ne sont pas chémo-spécifiques de l'ARN ni régio-spécifiques d'une position particulière. Ils fonctionnalisent donc de façon indifférenciée l'ADN ou l'ARN. De plus, la fonction diazo est difficilement compatible avec une conjugaison avec certaines cyanines, comme le Cy5 par exemple.

Or il est important de pouvoir être plus spécifique dans le mécanisme de fonctionnalisation, par exemple pour le marquage :

A) Dans le cas de puces à ADN mesurant les niveaux d'expression d'ARNm, l'ARN et lui seul doit être marqué. Or, dans un échantillon biologique complexe, ADN et ARNm peuvent être présents et donc marqués concomitamment. En utilisant un marqueur non chémo-spécifique de l'ARN, cela peut conduire à l'augmentation du bruit de fond, lors de l'hybridation.

B) Le marqueur, utilisé généralement en large excès, doit être détruit ou éliminé avant de mettre en contact les acides nucléiques marqués avec les sondes immobilisées sur la puce. En effet, dans le cas contraire, on risquerait alors de marquer les sondes, ce qui conduirait à un résultat impossible à interpréter. Le fait d'avoir un marqueur spécifique de l'ARN permettrait donc d'éviter ce problème de marquage des sondes du à un excès de marqueur non hydrolysé.

C) En raison des effets stériques, il est moins perturbant pour l'hybridation entre une sonde oligonuclétidique et une cible constituée d'acides nucléiques de marquer sur les extrémités du brin d'ARN cible (5' ou 3') plutôt qu'en interne. Or les techniques de marquage commerciales ne permettent pas une telle régio-spécifité du marquage. A notre connaissance, seules les techniques chimiques d'oxydation au périodate apportent ce degré de spécificité mais elles sont sévèrement impactées par la complexité du protocole de marquage (plus de trois à quatre réactifs et deux à trois purifications avant de disposer d'ARN marqué) ; voir à ce sujet :

- « An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe » par Ru-Qiang Liang Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 2 e17 dans Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 22 4535-4532, ou bien

- « Chemical methods of DNA and RNA fluorescent Labeling » Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 22 4535-4532. par Dmitri Proudnikov.

En fait, la fonctionnalisation régio-spécifique des extrémités 3' de l'ARN ne peut être obtenue qu'à partir de techniques enzymatiques extrêmement spécifiques. De telles techniques sont utilisées par exemple par Affymetrix (Santa Clara, USA) ou par Agilent Technologies (Santa Clara, USA) avec le marquage spécifique d'ARNs en 3' avec la T4 RNA Ligase et un substrat de type pCp-Marqueur ou par d'autres techniques enzymatiques décrites dans certaines références :

- Huang Z. "Selective labeling and detection of specific RNAs in an RNA mixture" Analytical Biochemistry 2003 129-133,
- Martin G. "Tailing and 3'-end labeling of RNA with yeast polys (A) polymerase and various nucleotides RNA 1998 22—230, ou
- Huang Z. "A simple method for 3'-labeling of RNA" Nucleic Acids Research 1996 4360-4361.

Le problème des techniques enzymatiques est leur sensibilité au type de substrat (taille et séquence de l'ARN à marquer) et bien sûr leur coût associé à la fois au substrat mais surtout à l'enzyme.

De plus, le développement récent de la détection des microARNs ou miARNs (ARNs non-codants de courte taille, propres aux cellules eucaryotes) qui peuvent être des marqueurs de pathologies nécessite des technologies de marquage par voie chimique, pratiques et surtout régio-spécifiques des ARNs et notamment de l'extrémité 3' pour limiter au maximum les effets d'encombrement stérique particulièrement marqués sur des duplex de petite taille. De

plus, ces petits oligomères se marquent très mal par les techniques enzymatiques justement en raison de leur taille comme décrit par F. Natt dans la référence : Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 7 e52.

Il y a donc un grand intérêt à disposer de technologies de fonctionnalisation chimique de faible coût qui en plus d'être spécifiques de l'ARN le seraient également de l'extrémité 3', et cela en toute indépendance de la taille et de la séquence du substrat à marquer.

D) Bien que la technologie de marquage diazo soit une excellente technique, la nature des étapes de synthèse conduisant à ces molécules n'est pas compatible avec la nature chimique de certains fluorophores (Cy5 par exemple qui est instable en présence d'hydrazine). La technologie diazo est donc préférentiellement utilisée avec de la biotine en tant que groupement d'intérêt. Or il y a un réel besoin de disposer de groupements d'intérêt directs portant un fluorophore, afin de s'affranchir d'étapes supplémentaires, telles que l'étape de détection des composés biotinylés par une molécule de streptavidine fluorescente. Il importe donc de disposer d'une technologie versatile ou le groupement réagissant avec les acides nucléiques (l'anhydride isatoïque par exemple) est chimiquement compatible avec une conjugaison avec divers groupements comme le Cy3 ou le Cy5 par exemple.

E) Enfin, la chémo-sélectivité de l'ARN vis-à-vis de l'ADN peut aussi avoir des applications en préparation d'échantillon également appelée « sample prep », telles que la sélection des ARNs sans utiliser une ADNase, la capture sélective d'ARN dans un milieu contenant de l'ADN, la décontamination, l'inhibition sélective de l'amplification, etc.

En 1982, Moorman (Moorman JACS 1982 104 6785-6786) a publié l'utilisation de l'anhydride isatoïque pour sa réactivité sélective avec les sérines de la chymotrypsine, ce qui conduit à l'inactivation de la protéine. Cette publication est l'une des premières qui démontre la réactivité de l'anhydride isatoïque sur les groupements hydroxyles d'une biomolécule, en milieu aqueux. Toutefois et curieusement alors que l'on s'attendrait à avoir une réactivité préférentielle avec les fonctions amines présentes sur la protéine, ces dernières étant plus nucléophiles, il est apparu que les fonctions alcool réagissent d'abord.

En 1983, Hiratsuka (Hiratsuka BBA 1983 742 496-508) publie l'un des premiers articles sur la réactivité de l'anhydride isatoïque ou de l'anhydride isatoïque méthylé sur des ribonucléosides libres (5' triphosphate ou 5'-OH). Ceci afin de synthétiser des substrats fluorescents d'enzymes pour l'étude de ces dernières. En effet, l'anhydride isatoïque, une fois ouvert, devient fluorescent. Il faut cependant, pour éviter toute confusion, faire la différence entre la fluorescence intrinsèque de l'anhydride isatoïque ouvert, qui devient une molécule d'anthranylate (Excitation : 335-350 nm et Emission : 427-446 nm), et la fluorescence que l'on apporte par conjugaison avec un fluorophore. On trouve en effet une multitude d'articles citant le marquage d'ARN par l'anhydride isatoïque, mais utilisant la fluorescence intrinsèque de l'antranylate pour le détecter. Leurs conclusions sont les suivantes :

- l'anhydride isatoïque ne réagit pas sur les amines exocycliques des bases, malgré une nucléophilie décrite habituellement pour être bien supérieure à celle des 2'-OH,
- l'anhydride isatoïque n'est pas connu pour réagir sur les 5'-OH,

l'anhydride isatoïque réagit préférentiellement (cinétiquement) sur le 2'-OH par rapport au 3'-OH (thermiquement favorisé). Cependant, en raison de la migration entre les positions 2' et 3' des groupements acyle, un mélange de l'ordre de 90% d'ester en 3' est obtenu.

Ovodov en 1990 (Ovodov, FEBS 1990 270 111-114), par des recherches basées sur des travaux de Khorana de 1963 (Stnark, Journal of the American Chemical Society 1963 75 2546 et Knorre Biokhimiya 1965 1218-1224), décrit l'acylation d'ARNs messager en milieu aqueux avec de l'anhydride acétique (DMF 5%, acétate de sodium à 1M, pH 7, 2 à 3 heures à température ambiante) pour protéger l'ARN vis-à-vis de l'action des ARNases. Il décrit un niveau d'acylation de 70-75% suffisant pour inhiber l'action des ARNases.

En 1993, Servillo (Servillo Eur. J.Biochem. 1993 583-589) publie un article démontrant le « marquage » spécifique en 3', d'ARN de transfert, après incubation avec de l'anhydride isatoïque (Molecular Probes, Eugene, USA) en milieu aqueux et à un pH de 8,8 pendant 3 heures et à température ambiante. Il démontre, par diverses techniques, une fonctionnalisation absolument régio-spécifique en 3'. Par hydrolyse totale avec de l'ARNase A et de l'ARNase T2, il montre la présence d'un seul nucléoside fluorescent. Avec l'inhibition de la phosphodiestérase, il démontre un marquage total en position 3', correspondant à un marquage régio-spécifique sans mentionner de marquage en 5'.

En 2000 paraît le premier article, d'une série en cours, de K. M. Weeks sur l'acylation sélective des hydroxyles en 2' de l'ARN. Cette série d'articles pondère les résultats de Servillo en termes de la régio-spécificité de l'acylation puisque Weeks décrit cette fois une acylation sélective de la position 2'OH de l'ARN. Elle couvre la littérature sur la

technique SHAPE (Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension) et comporte notamment les articles :

- K.A. Wilkinson, S.M. Vasa, K.E. Deigan, S.A. Mortimer, M.C. Giddings and K.M. Weeks, Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA. RNA 15, 1314-1321 (2009).
- K.E. Deigan, T.W. Li, D.H. Mathews and K.M. Weeks, Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 97-102 (2009).
- S.A. Mortimer and K.M. Weeks, Time-resolved RNA SHAPE chemistry. J. Am. Chem. Soc. 130, 16178-16180 (2008).
- C.M. Gherghe, S.A. Mortimer, J.M. Krahn, N.L. Thompson and K.M. Weeks, Slow conformational dynamics at C2'-endo nucleotides in RNA. J. Am. Chem. Soc. 130, 8884-8885 (2008).
- S.A. Mortimer and K.M. Weeks, A fast acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry. J. Am. Chem. Soc. 129, 4144-4145 (2007).
- K.A. Wilkinson, E.J. Merino and K.M. Weeks, Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. Nature Protocols 1, 1610-1616 (2006).
- K.A. Wilkinson, E.J. Merino and K.M. Weeks, RNA SHAPE chemistry reveals non-hierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in $tRNA^{Asp}$ transcripts. J. Am. Chem. Soc. 127, 4659-4667 (2005).
- E.J. Merino, K.A. Wilkinson, J.L. Coughlan and K.M. Weeks, RNA structure analysis at single nucleotide resolution by Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE). J. Am. Chem. Soc. 127, 4223-4231 (2005).

- S.I. Chamberlin and K.M. Weeks, Mapping local nucleotide flexibility by selective acylation of 2'-amine substituted RNA. J. Am. Chem. Soc. 122, 216-224 (2000).e
- K.M. Weeks, The mechanism of RNA SHAPE chemistry, J. Am. Chem. Soc. 134, 6617-24 (2012).

L'auteur utilise des dérivés de l'anhydride isatoïque (anhydride isatoïque N-méthylé, anhydride isatoïque, anhydride nitro isatoïque N-méthylé, anhydride nitro isatoïque) qu'il fait réagir sur des ARN de transfert ou de courts oligoribonucléotides modèles (milieu aqueux, pH 8, température ambiante ou 37°C, durant quelques heures). Seuls les 2'-OH peu contraints, c'est-à-dire peu engagés dans des structures secondaires ou tertiaires, sont acylés, car ils sont plus accessibles et moins près d'un squelette phosphate diester. Ils deviennent donc plus réactifs. Ensuite, cet ARN partiellement acylé est soumis à une transcription in vitro qui génère des fragments d'ADN plus ou moins longs, l'élongation s'arrêtant à chaque fois qu'un volumineux 2'-O-anthranylate, c'est-à-dire une molécule d'anhydride isatoïque ouverte qui s'est fixée sur le 2'-OH du sucre, est rencontré. Après séquençage ou analyse de ces fragments par électrophorèse capillaire, on peut établir une cartographie de la structure tertiaire des ARN messagers ainsi soumis à cette technique. Il s'agit du principe de la technique SHAPE (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension).

En 2008, un article de Li, « Aptamers that recognize drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase » Na Li, Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 21 6739-6751, cite les travaux de Weeks pour marquer spécifiquement les 2'-OH en interne qui seraient les plus accessibles et décrire ainsi une cartographie structurale de l'ARN en question.

En 2007, Thomas Cech (Cech T. R. RNA 2007 536-548) utilise également cette technique pour étudier la structure d'ARNs cristallisés.

L'état de la technique comporte également d'autres brevets sur la capture.

Le brevet US-B-7,244,568 porte sur l'acylation sélective, plus ou moins partielle, des 2'-OH de l'ARN avec des groupements hydrophobes (butyryle ou pentanoyle à partir des anhydrides correspondants). L'ARN devient ainsi suffisamment hydrophobe pour être extrait sélectivement par un solvant organique, ou être sélectivement immobilisé (par exemple sur une phase inverse, de la silice, une membrane, etc.). Il est décrit également une phase solide activée par un chlorure d'acide ou un anhydride qui permet de sélectivement immobiliser les molécules d'ARN par rapport aux molécules d'ADN. Cette phase peut être réalisée par de l'anhydride isatoïque immobilisé ou le BCPB (Benzyl chloride immobilisé sur polystyrène). Enfin, il est également décrit une technique pour doser des ARN adsorbés sur une phase solide : les 2'-OH des ARN immobilisés sont mis en réaction avec de l'anhydride isatoïque, la fluorescence intrinsèque générée permet de doser l'ARN immobilisé.

Des études plus poussées démontrent que dans les conditions prônées par ce brevet, l'ADN est fonctionnalisé de la même manière car les anhydrides, qui sont utilisés, ne sont pas chémo-spécifiques et attaquent aussi bien les amines exocycliques des bases que les groupements hydroxyles du sucre.

Le brevet EP-B-1.196.631, propose des agents acylants compatibles avec une acylation régiospécifique de l'ARN en milieu aqueux. Ces agents acylants ne doivent pas apporter une

trop grosse gêne stérique afin de maintenir les propriétés d'hybridation de l'ARN ainsi modifié. Ce sont principalement des agents acylants permettant l'introduction d'un groupement acétyle ou formyle qui sont utilisés. L'ARN ainsi modifié partiellement sert ensuite de matrice pour une réaction de polymérisation, il peut servir également de sonde dans une réaction de Northern blot. L'idée est de maintenir les propriétés d'hybridation (l'ARN modifié reste le substrat d'une réaction d'élongation), tout en détruisant les structures secondaires par la présence du groupe en 2' et en rendant l'ARN ainsi modifié résistant vis-à-vis des nucléases. De plus, l'exemple 22 indique que le marquage fluorescent de l'ARN est envisagé, mais uniquement par adjonction de l'anhydride isatoïque méthylé, il s'agit donc d'une fluorescence intrinsèque.

Le brevet EP-B-1.196.631 propose un polynucléotide comprenant ARNm, ARNr ou ARN viral, pour lequel plus de 25 % des riboses sont modifiés de manière covalente au niveau des positions 2'-OH. De plus, il concerne une méthode pour produire des oligonucléotides et polynucléotides double brin à partir d'un brin d'acide nucléique de départ, à partir d'une pluralité de mononucléotides (UTP, dTTP et/ou dUTP, ATP et/ou dATP, GTP et/ou dGTP, et CTP et/ou dCTP), en présence de polymérase et éventuellement d'amorces permettant la formation d'un brin d'acide nucléique complémentaire à l'acide nucléique de départ.

La demande de brevet WO-A-2004/013155 décrit la modification chimique de l'ARN dans un mélange de type fèces, sang, etc., afin de différencier l'ADN de l'ARN. C'est l'anhydride acétique qui est le réactif capable de faire cette différenciation. On hydrolyse ensuite la fonction ester afin de régénérer l'ARN biologiquement actif. Pour cela, cette demande propose de protéger l'utilisation de bases organiques

« peu » agressives pour l'ARN (lysine, diamines etc.), en association avec un protocole de déprotection.

De l'ensemble de ces documents, on note que seule la fluorescence intrinsèque de l'anhydride isatoïque une fois ouvert est utilisée. De plus l'utilisation de cette molécule et de ses dérivés pour d'autres applications n'est pas décrite comme le propose la présente invention.

En ce qui concerne la fluorescence de l'anhydride isatoïque, il est peu intéressant de n'avoir que la fluorescence de l'anhydride isatoïque pour pouvoir détecter les ARNs. Ainsi cette fluorescence est faible comparée à d'autres composés fluorescents et pas forcément compatible avec la longueur d'onde des lasers utilisés de façon courante dans les automates de détection. De plus, avec la fluorescence intrinsèque de l'anhydride isatoïque ouvert, les applications sont limitées à de la détection monoplex et non multiplex comme c'est de plus en plus le cas en biologie moléculaire. Par exemple, le marquage pour des applications dans le domaine des puces à ADN n'est pas possible avec ces brevets car l'utilisateur ne pourra pas différencier une détection d'un premier type d'acides nucléiques de celle d'un second type d'acides nucléiques, tous les deux marqués avec l'anhydride isatoïque.

Dans l'état de la technique, il y a globalement quatre utilisations différentes de l'anhydride isatoïque. Tout d'abord, il s'agit d'exploiter les propriétés de fluorescence intrinsèques d'esters de l'acide anthranylique pour étudier le mécanisme de certaines enzymes. Deuxièmement, l'utilisation des propriétés acylantes de l'anhydride isatoïque pour inhiber de manière régio-sélective la polymérisation des acides nucléiques, il ne s'agit donc que d'introduire un substituant volumineux en 2' dans des conditions les plus douces possibles

et cela de façon plus ou moins ménagée. Troisièmement, l'état de la technique utilise l'anhydride isatoïque pour empêcher leur dégradation lors d'une étape d'extraction. Finalement et quatrièmement, il s'agit d'extraire sélectivement l'ARN acylé par rapport à l'ADN non acylé. Il y alors une idée de réversibilité de la fonction ester de manière à régénérer une fonction 2'OH libre et donc un ARN fonctionnel.

L'idée de conjuguer la molécule d'anhydride isatoïque à de la biotine ou à un Cy3 pour des applications dans le marquage des ARNm pour hybridation sur au moins deux spots différents ou sur puce à ADN n'est donc pas évidente car la conjugaison avec un groupement d'intérêt peut entraîner une modification des propriétés acylantes et même de la stabilité de l'anhydride isatoïque, propriétés qui sont difficilement prévisibles. En particulier, la conjugaison de l'anhydride isatoïque au groupement d'intérêt doit se faire par le biais d'atomes et de liaisons qui peuvent entraîner une très forte déstabilisation de la structure, une très grande difficulté dans la synthèse, une mauvaise solubilité dans l'eau, une perte des propriétés physico-chimiques du groupement d'intérêt par atténuation de la fluorescence, une très mauvaise réactivité vis-à-vis de l'ARN, une très grande instabilité des duplex formés entre l'ARN marqué et l'ADN (sondes de capture notamment par gène stérique trop importante ou par le fait que les hybrides ARN fonctionnalisés / ADN ne soient plus des substrats de polymérase).

Les inventeurs ont par ailleurs compris l'intérêt de la fonctionnalisation d'ARNs par les composés d'anhydride isatoïque afin de permettre leur capture par des molécules de reconnaissance portées ou non par un support solide.

De plus, ils ont proposé une précédente invention, WO-A-2012/076794, consistant à utiliser l'anhydride isatoïque non

pas pour sa fluorescence intrinsèque mais pour sa capacité à se fixer spécifiquement sur l'ARN et à permettre la liaison avec un groupement d'intérêt, tel que défini plus loin.

Comme indiqué précédemment, une des techniques les plus répandues pour l'extraction des acides nucléiques est une technique d'adsorption sur de la silice en présence de sels chaotropiques (technologie dite BOOM), qui malgré son efficacité et sa grande capacité à être automatisée présente l'inconvénient d'être générique et peu spécifique de l'ARN, sinon par l'utilisation de tampons d'élution de formulation complexe dont la composition reste empirique.

Brièvement, la technologie est basée sur l'affinité particulière qui se crée entre les acides nucléiques, la silice et des cations qui feraient le lien entre les groupements phosphates et les résidus silanols présents à la surface de la silice comme il est décrit dans « Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Vol 162 Edited by S. Mitra Wiley-Interscience 2003 ».

De nombreuses variantes de la technologie BOOM ont été protégées pour améliorer le rendement d'extraction, éviter la co-purification d'inhibiteurs de l'amplification.
On citera à ce sujet quelques brevets décrivant des améliorations de la chimie BOOM.

Le brevet EP-B-1.367.137 décrit l'amélioration de la technologie BOOM en utilisant des particules de silice magnétiques pour l'extraction des acides nucléiques, permettant une automatisation bien plus facile.

Le brevet EP-B-1.476.550 présente une méthode de purification des acides nucléiques utilisant une phase solide modifiée avec des thioéthers et des éluants constitués de sels lyotropiques.

Le brevet EP-B-1.266.385 propose des particules de silice ferromagnétiques ou ferrimagnétiques pour la purification des acides nucléiques.

Le brevet EP-B-1.762.618 expose une solution pour extraire des acides nucléiques du sang, constituée de 15 à 35% de guanidine et d'un détergent.

Le brevet EP-B-1.771.562 décrit une nouvelle méthode d'extraction des acides nucléiques basée sur la silice en présence d'adjuvants organiques.

Enfin, le brevet EP-B-1.589.105 propose l'extraction d'acides nucléiques à pH acide sur des particules magnétiques non recouvertes de silice.

Cependant si ces techniques, basées sur des interactions non covalentes entre des acides nucléiques et un support solide, sont à ce jour majoritairement utilisées dans les automates d'extraction des acides nucléiques utilisés, aucune ne permet de discriminer de façon spécifique l'ARN de l'ADN. Il y a donc un besoin à développer des techniques sélectives.

Il a été également proposé des techniques d'extraction un peu plus sélectives des acides nucléiques par interaction non covalente avec un support solide. Il y a peu de documents décrivant expressément l'extraction sélective et automatisée, à partir d'un mélange biologique complexe, soit uniquement de l'ARN soit uniquement de l'ADN.

Toutefois, le brevet EP-B-1.448.799 présente la purification plus ou moins sélective d'acides nucléiques sur de la silice à pH alcalin et en présence de divers anions.

La demande de brevet EP-A-1.510.577 tente de protéger l'utilisation d'un mélange de sels chaotropiques et d'additifs hydrophiles pour optimiser la séparation ADN par rapport à ARN.

Le brevet EP-B-1.479.769 décrit et revendique une séparation sélective entre ARN et ADN. Celle-ci est basée sur des changements de température, de force ionique et de composition chimique de certaines solutions tamponnées.

Le brevet EP-B-1.869.179 propose l'utilisation de ligands spécifiques de l'ARN ou de l'ADN pour l'extraction spécifique de l'ARN par rapport à l'ADN.

La demande de brevet US-A-2007/0148651 présente l'extraction spécifique de l'ARN, à partir d'un mélange d'ADN et d'ARN, par adsorption de l'ARN sur des particules de magnétite en présence d'anions phosphates.

La demande de brevet WO-A-2009/040444 décrit la précipitation sélective d'ADN génomique sur des particules de magnétite recouvertes de chitosane, à partir d'un mélange ADN/ARN. L'ARN étant ensuite récupéré dans le surnageant par précipitation à l'alcool.

Enfin, on citera les brevets US-A-2005/0106576 et US-A-2005/0106577 qui protègent : un fragment de liaison d'acide nucléique, dite NABP ou « nucleic acid binding portion », reliée à un support solide par le biais d'un linker clivable. La NABP est une molécule chargée ayant une affinité pour les

acides nucléiques mais aucune sélectivité de l'ARN par rapport à l'ADN. De plus, la NABP est portée par un support solide avec tous les inconvénients que cela comporte comparativement à notre invention, tels que l'adsorption non spécifique, la gêne stérique, etc.

On notera que toutes ces techniques sont aussi basées sur une interaction non covalente entre les acides nucléiques (ARN ou ADN) et une phase solide, en présence de différents additifs, qui vont en moduler l'adsorption plus ou moins sélectivement. Les interactions mises en jeu lors de l'adsorption des acides nucléiques sont de nature faible (électrostatiques, ioniques, hydrophobes, liaisons hydrogène, etc…) en comparaison à un lien covalent.

On voit donc que malgré des tentatives d'amélioration aucune technique n'est réellement satisfaisante et ne permet une sélectivité absolue entre ARN et ADN. Il y a donc une réelle nécessité à proposer de nouvelles techniques innovantes.

Il a ensuite été proposé des techniques d'extraction sélective de l'ARN vis-à-vis de l'ADN. Les seules techniques pour extraire de l'ARN de façon relativement sélective avec un minimum de contamination par de l'ADN sont basées :

- sur des techniques chimiques comme l'extraction au phénol/chloroforme (Trizol®), qui bien qu'étant efficaces, nécessitent l'utilisation de solvants organiques et présentent donc des inconvénients en termes de toxicité, d'automatisation difficile, etc.,
- sur des techniques enzymatiques avec l'ajout d'une ADNase ou d'une ARNase, avec toutefois l'inconvénient du coût et de la dénaturation nécessaire de ces enzymes après leur action,

- sur des techniques physico-chimiques comme la centrifugation différentielle sur gradient de sels de Chlorure de Césium extrêmement complexes à automatiser et qui sont basées sur la densité relative des biomolécules,
- sur des techniques de capture spécifique utilisant des particules magnétiques recouvertes d'oligonucléotides poly-dT afin de reconnaître spécifiquement les séquences polyA des ARN messagers avec l'inconvénient que seuls les ARNm sont capturés sans que les ARN ribosomaux, les µRNA et autres « petits » ARN ne soient reconnus.

La demande de brevet correspondante, WO-A-2012/076794, est incorporée ici par référence. Dans cette demande, la Demanderesse apportait un début de solution à la problématique de séparation entre ARN et ADN à partir d'un milieu complexe. Il était proposé de discriminer l'ARN de l'ADN sur la base de leur composition chimique. En effet la seule différence entre l'ARN et l'ADN réside dans la présence d'un groupement hydroxyle en 2' du ribose. L'objectif était donc de tirer parti de cette fonction pour y coupler spécifiquement une molécule de liaison (un dérivé d'anhydride isatoïque) munie d'un groupement d'intérêt permettant de réaliser un tri moléculaire entre les deux macromolécules, basé sur le reconnaissance spécifique du groupement d'intérêt. La molécule réactive de liaison devait pouvoir réagir en conditions douces (65°C, durée inférieure à 1 heure et en milieu aqueux).

Par un choix approprié des groupements d'intérêt apportés sur l'ARN, comme par exemple certain groupements ayant une affinité particulière pour une phase solide, il est donc possible d'extraire l'ARN spécifiquement d'un milieu complexe. Après fonctionnalisation spécifique de l'ARN, ce dernier peut être immobilisé sur la phase solide alors que l'ADN purifié était élué (tout en pouvant être récupéré pour être amplifié spécifiquement). L'ARN capturé et exempt d'ADN peut alors être

séparé de son groupement d'intérêt directement sur la phase solide pour pouvoir à son tour être spécifiquement élué et amplifié.

Cette méthode permet donc de trier et séparer l'ARN de l'ADN avec une très grande sélectivité, et consiste à :

1- Réaliser une liaison covalente entre l'ARN et une molécule de liaison (dérivé d'anhydride isatoïque) portant un groupement d'intérêt.

2- Trier l'acide nucléique ainsi fonctionnalisé, par l'intermédiaire du groupement d'intérêt, par rapport à celui qui ne l'a pas été.

3- Cliver la liaison entre l'ARN et le groupement d'intérêt afin de libérer un ARN biologiquement actif (anthranylate ou nu) et totalement exempt d'ADN. Cependant si la Demanderesse a démontré parfaitement la réalité du tri ARN versus ADN, notamment dans l'exemple 14, il y a toujours une volonté d'améliorer l'efficacité de ce protocole, essentiellement par la conception d'une nouvelle famille de molécules à base de composés aza-isatoïques plus à même de répondre à cette problématique.

Ainsi, la présente invention permet :

- d'augmenter encore plus la réactivité de l'anhydride isatoïque pour :
  - pouvoir fonctionnaliser à température ambiante, et non à 65°C, de manière à faciliter l'intégration de ce procédé dans un automate de diagnostic industrialisable,
  - minimiser la consommation de réactif d'anhydride aza-isatoïque acylant dans la perspective d'une application industrielle de ce procédé (abaissement du coût en réactif),

- faciliter l'élimination de l'excès de réactif pour améliorer l'intégration de ce protocole dans une plateforme de diagnostic,
- augmenter encore plus l'enrichissement en ARN par rapport à l'ADN.

- d'augmenter encore plus la solubilité en milieu aqueux toujours dans le but de faciliter l'élimination de l'excès de réactif et augmenter sa réactivité,
- disposer, après réaction de la molécule de liaison et clivage du bras de liaison, d'un ARN « nu » et sans groupements aza-anthranylates (dans le but d'éviter toute inhibition qui proviendrait de l'aza-anthranylate),
- appliquer le concept à d'autres utilisations, comme :
  - conférer à l'ARN une résistance absolue aux nucléases par fonctionnalisation non ménagée de l'ARN,
  - l'inhibition de l'amplification sélective de l'ARN dans un mélange ARN/ADN,
  - le marquage d'acides ribonucléiques pour une application puce à ADN ou autres.

Dans le cadre de cette demande de brevet nous apportons une solution nouvelle au tri de l'ARN versus d'autres molécules par le biais d'une nouvelle molécule :

- plus réactive et donc plus efficace car capable de pouvoir fonctionnaliser à température ambiante de l'ARN,
- plus économique car nécessitant une plus faible concentration pour le même effet et par corollaire plus facile à éliminer,
- plus soluble du fait que l'introduction d'un groupement pyridynyle augmente la solubilité en milieu aqueux,
- plus sélective et donc plus à même de résoudre le problème de l'extraction sélective,

- dotée éventuellement d'une fonctionnalité supplémentaire avec un bras méthyl disulfure substitué qui par clivage permet de régénérer un ARN nu qui évite tout problème d'inhibition d'amplification ultérieur,
- applicable à d'autres utilisations.

Par définition, un groupement d'intérêt est une molécule qui :

- est une molécule réactive ou un groupement réactif capable de réagir avec une autre molécule réactive ou un autre groupement réactif dans certaines conditions (exemple d'un nucléophile et d'un électrophile, d'un alcyne avec un azide, d'un maléimide avec un thiol, d'un diène avec un alcène, etc.), et/ou
- possède une fluorescence qui lui est propre et qui est différente de celle de l'anhydride isatoïque ouvert (ester anthranilique), et/ou
- est un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable et éventuellement réversible, du type biotine/streptavidine, molécule hydrophobe ou hydrophile/support hydrophobe ou hydrophile, antigène/anticorps, saccharide ou polysaccharide/lectine, etc., et/ou
- est une molécule de marquage pour une réaction indirecte constituée par un couple ligand/récepteur du type :
  - biotine/streptavidine,
  - haptène/anticorps,
  - antigène/anticorps,
  - peptide/anticorps,
  - saccharide ou poly-saccharide /lectine,
  - molécule électrophile/molécule nucléophile,

- polynucléotide/complémentaire du polynucléotide,
- ligand hydrophobe/phase solide hydrophobe, ou
- ligand/métal de coordination.
-

Par molécule de liaison, il faut comprendre un anhydride aza-isatoïque ou ses dérivés. A noter que lorsque l'anhydride aza-isatoïque est ouvert après réaction avec un nucléophile, il porte alors le nom d'aza-anthranylate.

Par dérivés de l'anhydride aza-isatoïque, il faut comprendre tous composés organiques comportant une partie correspondant à l'anhydride aza-isatoïque et portant sur la partie aromatique ou sur la partie hétérocyclique de ce dernier au moins un radical, tel qu'un groupement chimique ou organique.

Par « fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique », l'on entend l'action de greffer un groupement d'intérêt - par liaison covalente ou non - sur ladite molécule d'acide ribonucléique. En fonction du type de groupement d'intérêt greffé (marqueur, précurseur de marquage, groupement permettant la capture par au moins un moyen de capture, la séparation ou l'inhibition de molécules biologiques etc.), le terme « fonctionnalisation » ou les termes apparentés (« fonctionnaliser » par exemple) désignent le marquage – direct ou indirect – de ladite molécule d'acide ribonucléique par une molécule détectable, l'addition d'un groupement sur ladite molécule d'acide ribonucléique permettant la capture, la séparation ou l'inhibition de cette dernière etc.

Par bras de liaison, on définit un bras espaceur de nature organique, tel qu'une simple liaison covalente, permettant de relier la molécule de liaison et le groupement d'intérêt. Il peut comporter une fonction susceptible d'être clivée par un

moyen physico-chimique, photochimique, enzymatique, chimique, thermique, etc.

Par moyen ou molécule de reconnaissance ou de capture, on définit une molécule immobilisée ou non sur un support solide ayant une forte affinité pour le groupement d'intérêt.

La définition d'un ARN est un polymère naturel ou synthétique constitué d'au moins deux unités ribonucléotidiques successives modifiées ou non.

Le terme ADN est défini par un polymère naturel ou synthétique constitué d'au moins deux unités désoxyribonucléotidiques successives modifiées ou non.

Il est également possible d'utiliser des simples brins chimériques constitués d'au moins un segment d'ADN et au moins un segment d'ARN.

Par inhibition, on entend l'incapacité de l'ARN excessivement fonctionnalisé par un dérivé de l'anhydride isatoïque à être amplifié par une technologie d'amplification de matériel génétique (NASBA, PCR, etc.)

Par définition le mot sucre est un composé ribose ou désoxyribose.

Par échantillon liquide, il faut comprendre une solution aqueuse homogène ou hétérogène dans laquelle les acides nucléiques sont totalement solubles. La solution est dite hétérogène, par exemple lorsqu'elle contient un support solide ayant éventuellement des ARNs fixés sur sa surface.

Le groupement pyridinyle est choisi en se basant sur le fait qu'outre la solubilité, sa capacité à attirer les électrons fait qu'il augmente la réactivité de la fonction carbonyle en la rendant plus apte à une attaque nucléophile des groupements hydroxyles de l'ARN.

Le choix par la Demanderesse de la position de substitution du noyau pyridinyle en position 6, 7 ou 8 peut également avoir un impact sur la stabilité de la molécule finale. Bien que pour l'homme du métier, il est techniquement plus aisé de substituer la position 6 dans le cas de la molécule BiotPEG4SS Pyr IA Me (**14**), il peut également mettre en œuvre des solutions techniques pour substituer les positions 7 ou 8.

Dans le cas de l'introduction de deux bras de liaison, éventuellement liés à un groupement d'intérêt, la difficulté de synthèse est encore augmentée car un bras de liaison permettant l'auto-immolation de l'anthranylate doit obligatoirement être incorporé en position 5 (cf. formule (2) infra et figure 2). Il n'a jamais été décrit de molécules aza-isatoïques substituées deux fois avec des bras de liaison pour des applications de tri de biomolécules.

La présente invention concerne un procédé de fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), contenu dans un échantillon liquide, qui comprend les étapes suivantes :

a) disposer d'au moins :

- une molécule de liaison constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés,
- un groupement d'intérêt, et
- un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt,

b) faire réagir la fonction anhydride de la molécule de liaison avec au moins un groupement hydroxyle porté :

- en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
- en position(s) 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide à l'extrémité 3' terminal de l'ARN, et

c) obtenir un aza-anthranylate reliant, à l'aide du bras de liaison, l'ARN au groupement d'intérêt.

La présente invention concerne également un procédé de marquage d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), contenu dans un échantillon liquide, qui comprend les étapes suivantes :

a) disposer d'au moins :

- une molécule de liaison constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés, ayant une fluorescence intrinsèque,
- un groupement d'intérêt, ayant un signal de fluorescence intrinsèque, mais différent du signal émis par la molécule de liaison, ou n'ayant pas de signal de fluorescence intrinsèque, et
- un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt,

b) faire réagir la fonction anhydride de la molécule de liaison avec au moins un groupement hydroxyle porté :

- en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
- en positions 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide terminal en position 3' de l'ARN, et
- obtenir un aza-anthranylate reliant, à l'aide du bras de liaison, l'ARN au groupement d'intérêt.

La présente invention concerne aussi un procédé de capture ou de séparation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN) qui comprend les étapes suivantes :

a) disposer d'au moins :
   - une molécule de liaison constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés,
   - un groupement d'intérêt constitué par un ligand complémentaire d'un anti ligand, et
   - un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt,
b) faire réagir la fonction anhydride de la molécule de liaison avec au moins un groupement hydroxyle porté :
   - en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
   - en positions 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide terminal en position 3' de l'ARN, et
c) obtenir un aza-anthranylate, reliant à l'aide du bras de liaison, l'ARN au groupement d'intérêt,
d) capturer ou séparer l'ARN par l'intermédiaire d'une réaction entre un ligand et un anti-ligand.

Dans le cadre du procédé de capture ou de séparation, il peut y avoir une étape supplémentaire consistant à :

e) réserver ou éliminer les molécules d'ARN ainsi capturées ou séparées et utiliser le reste de l'échantillon enrichi en ADN.

Dans tous les cas de figure des procédés précédemment cités, et selon une première variante de réalisation, le bras de liaison est associé à la molécule de liaison avant que ledit bras de liaison soit associé au groupement d'intérêt.

Dans tous les cas de figure des procédés précédemment cités, et selon une seconde variante de réalisation, le bras

de liaison est associé à la molécule de liaison après que ledit bras de liaison est associé au groupement d'intérêt.

Quelle que soit la variante de réalisation, la molécule de liaison est préalablement associée à l'ARN.

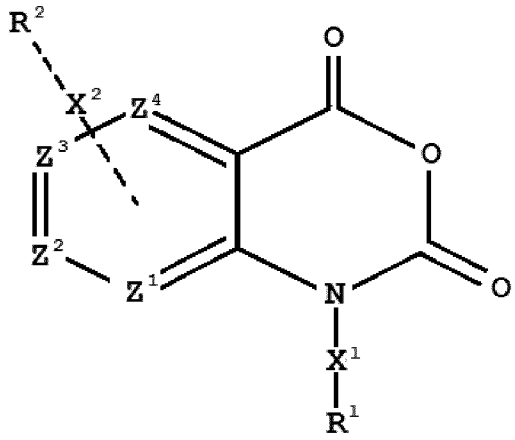
La présente invention concerne toujours un procédé de capture sélectif d'au moins une molécule d'ARN utilisant au moins une molécule de liaison, un groupement d'intérêt, constitué par un ligand complémentaire d'un anti-ligand, et un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt, la molécule de liaison étant constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés, qui se fixe par liaison covalente au niveau d'un groupement hydroxyle porté :

- en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
- en positions 2' et 3' du ribose du nucléotide terminal en position 3' de l'ARN, et/ou
- en position 3' du ribose dudit nucléotide terminal en position 3' de l'ARN.

La présente invention concerne enfin un procédé de séparation de molécules d'ARN par rapport à d'autres constituants biologiques, notamment des molécules d'ADN consistant à :

- appliquer le procédé de capture susvisé à un échantillon biologique contenant des acides nucléiques indifférenciés (ARN et ADN), les groupements d'intérêt étant associés à au moins un support solide facilement séparable du reste de l'échantillon biologique, et
- séparer les molécules de liaison portant les molécules d'ARN du reste de l'échantillon biologique.

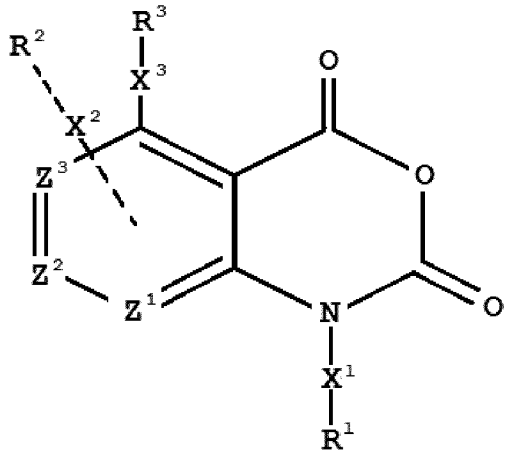
La présente invention propose également un réactif de fonctionnalisation, de formule (1) :



dans lequel :

- R^1 et R^2 représentent, indépendamment l'un de l'autre, H ou un groupement d'intérêt, sachant qu'au moins un parmi les radicaux R^1 et R^2 est représenté par un groupement d'intérêt, et
- le groupement d'intérêt peut être :
    a. un marqueur ou un précurseur de marquage, ou
    b. un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable,
- X^1 et X^2 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un bras de liaison qui relie le groupement d'intérêt à la molécule de liaison,
- un seul des radicaux Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 est constitué par un atome d'azote (N), les autres radicaux sont constitués par un atome de carbone (C).

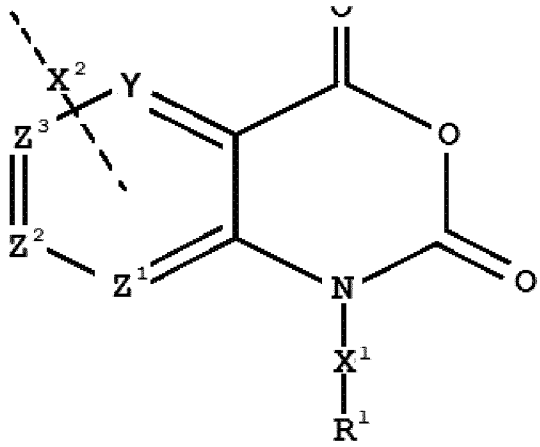
Plus précisément, l'invention propose un réactif de fonctionnalisation, de formule (2) :



dans lequel :

- R^1, R^2 et R^3 représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupement d'intérêt, sachant qu'au moins un parmi les radicaux R^1, R^2 et R^3 est représenté par un groupement d'intérêt, et
- le groupement d'intérêt peut être :
    a. un marqueur ou un précurseur de marquage, ou
    b. un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable,
- X^1, X^2 et X^3 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, des bras de liaison qui relient le groupement d'intérêt à la molécule de liaison,
- un seul des radicaux Z^1, Z^2 et Z^3 est constitué par un atome d'azote (N), les autres radicaux sont constitués par un atome de carbone (C).

L'ensemble constitué par les réactifs de fonctionnalisation de formule (1) et ceux de formule (2) peut également être représenté par la formule (I) suivante :



dans lequel :

- Y représente Z^4 ou le groupement $C\text{-}X^3\text{-}R^3$,
- R^1, R^2 et R^3 (lorsque Y = $C\text{-}X^3\text{-}R^3$) représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupement d'intérêt, sachant qu'au moins un des radicaux R^1, R^2 et R^3 (lorsque Y = $C\text{-}X^3\text{-}R^3$) représente un groupement d'intérêt, et
- le groupement d'intérêt est sélectionné parmi :
    c. un marqueur ou un précurseur de marquage, ou
    d. un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable,
- X^1, X^2 et X^3 (lorsque Y = $C\text{-}X^3\text{-}R^3$) représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, des bras de liaison qui relient le groupement d'intérêt à la molécule de liaison,
- un seul des radicaux Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 (lorsque Y = Z^4) est constitué par un atome d'azote (N), les autres radicaux sont constitués par un atome de carbone (C).

Quel que soit le réactif utilisé, si celui-ci est utilisé pour la capture ou la séparation, le moyen de capture ou de séparation est constitué par un support solide, tel que particules de polymère ou de silice, magnétiques ou non, ou un filtre ou bien par la paroi interne d'un récipient.

Quel que soit le réactif utilisé, si celui-ci est utilisé pour la fonctionnalisation, le bras de liaison X est un bras

espaceur organique permettant de relier la molécule de liaison et le groupement d'intérêt, tel qu'une simple liaison covalente entre la molécule de liaison et le groupement d'intérêt ou un simple atome de carbone, éventuellement substitué, un enchaînement d'au moins deux atomes de carbone, contenant éventuellement des structures aromatiques et/ou des hétéro-atomes (oxygène, soufre, azote, etc.).

Selon cette dernière variante de réalisation du réactif de fonctionnalisation, le bras de liaison X comporte une fonction ou une liaison capable d'être clivée par un moyen physico-chimique, photochimique, thermique, enzymatique et/ou chimique permettant la séparation de la molécule de liaison par rapport à l'ARN dans des conditions de lumière, de température, enzymatiques ou chimiques particulières.

L'invention présente également une molécule biologique d'ARN fonctionnalisée susceptible d'être obtenue par l'un des procédés mentionnés plus haut.

L'invention se propose de couvrir aussi un kit de détection d'une molécule d'ARN cible comprenant un réactif, tel que décrit ci-dessus.

Enfin, quel que soit le procédé, l'invention a trait à un procédé de fonctionnalisation, qui comprend l'étape supplémentaire suivante entre les étapes a) et b) consistant à hydrolyser le groupement monophosphate terminal en position 3' de chaque brin d'ARN à fonctionaliser.

Dans un mode de réalisation, un bras de liaison, lié ou non à un groupement d'intérêt, substitue le groupement pyridynyle. De plus, la fonction clivable est conçue et est positionnée de telle sorte qu'elle puisse former après clivage

un hétérocycle cyclique de 5 à 8 chaînons avec la fonction carbonyle de l'ARN aza-anthranylate et libérer ainsi un ARN nu, possédant ses 2'-OH libres (**2**), utilisable dans tout mode d'amplification, détection ou protection de l'ARN et où il est nécessaire d'éviter absolument toute inhibition potentielle qui serait due à l'aza-anthranylate.

Ce dernier mode de réalisation repose préférentiellement sur la formation d'une aza thio-lactone se formant spontanément lors du clivage de la fonction clivable disulfure (-SS-) du bras de liaison porté par la position 5. De tels systèmes auto-immolables n'ont jamais été décrits en série aza-isatoïque et dans le but de libérer un ARN.

Ce dernier mode de réalisation permet en outre d'éviter la libération de sous produits lors de l'hydrolyse avec le DTT, la thiolactone restant sur le support. On peut également concevoir des systèmes similaires avec une fonction clivable du type -OR, -NR permettant, après élimination du groupement R, de libérer respectivement une fonction alcool ou amine permettant une cyclisation avec la fonction carbonyle de l'ARN-anthranylate pour libérer également un ARN « nu ».

L'invention sera mieux comprise à l'aide de la description détaillée qui est exposée ci-dessous au regard des figures annexées, à savoir :

La **Figure 1** montre le principe du tri d'ARN utilisant un anhydride aza-isatoïque selon un premier mode de réalisation.

La **Figure 2** présente le principe du tri d'ARN en présence d'un anhydride aza-isatoïque doté d'un groupement induisant la libération de la molécule d'ARN « nu » dans un second mode de réalisation, dit anhydride aza-isatoïque auto-immolable.

La **Figure 3** décrit la synthèse d'un dérivé aza-isatoïque doté d'un groupement d'intérêt biotinylé.

La **Figure 4** présente un graphe sur l'étude de la stabilité en solution d'un composé aza-isatoïque comparée à celle d'un composé isatoïque.

La **Figure 5** montre un graphe sur des tests de fonctionnalisation d'un ORN 27 mers avec des dérivés d'anhydride isatoïque et aza-isatoïque.

La **Figure 6** propose de mettre en exergue la chémo-sélectivité de la série aza-isatoïque pour l'ARN par rapport à celle de l'ADN.

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

- ACN : Acétonitrile,
- AcOEt : acétate d'éthyle,
- Boc_2O : dicarbonate de di-*tert*-butyle,
- ADN : acide désoxyribonucléique,
- ARN : acide ribonucléique,
- Biot-peg_4-COPFP : ester de l'acide 3-(2-(2-(3-biotine-$dPEG_3$-propanamido)éthyl)disulfanyl) propanoïque et du pentafluoro phénol
- Biot-peg_4-SS-azaIAMe : molécule 14 de la présente demande (1-{5-[(3aS,6aR)-2-oxo-hexahydro-1H-thiéno[3,4-d]imidazolidin-4-yl]pentanamido}-N-(2-{[2-(3-{1-méthyl-2,4-dioxo-*1H,2H,4H*-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin-6-yl} propanamido)éthyl]disulfanyl}éthyl)-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-amide),
- Biot-peg_4-SS-IAMe : anhydride 5-(3-(2-(2-(biotine-$dPEG_3$-propanamido)éthyl)disulfanyl))propanamido) isatoïque, tel que décrit dans l'exemple 1-10 de la demande WO-A-2012/076794,
- CCM : chromatographie sur couche mince,
- $CDCl_3$: Chloroforme deutéré,
- d : doublet,
- DCM : dichlorométhane,
- dd : doublet dédoublé,

- DMF : diméthylformamide,
- DMSO : diméthylsulfoxide,
- DMSO-d6 : diméthylsulfoxide deutéré,
- Eau MilliQ : Eau ultrapure (Millipore, Molsheim, France),
- EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide,
- Eq : équivalents,
- EP : éther de pétrole,
- Et_2O : éther diéthylique,
- HPLC : chromatographie liquide haute performance,
- HOBt : hydroxybenzotriazole,
- IA : anhydride isatoïque,
- IVT : transcrits *in vitro*
- m : multiplet,
- Me : méthyl,
- MeOH : méthanol,
- Nb exp : Nombre de répétition de l'expérience,
- nd : non déterminé,
- NHS : N-hydroxysuccinimide,
- NIS : N-iodosuccinimide,
- NMO : N-méthylmorpholine,
- NP1 : Nucléase P1,
- ODN : Oligo-désoxyribonucléotide,
- ORN : Oligo-ribonucléotide,
- PA : Phosphatase alcaline,
- PBS 1x : Phosphate Buffered Saline = (0.01 M PO_4^-, 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH=7.4 à 25°C ref SIGMA 4417, Saint Louis, USA),
- PFP : pentafluorophénol,
- q : quadruplet,
- Rdt : rendement,
- Rf ou TR : temps de rétention,
- RMN : résonance magnétique nucléaire,
- rpm : tours par minute,
- s : singulet,

- SS : lien disulfure,
- t : triplet,
- Ta or TA : Température ambiante,
- TEAAc : Triéthyl ammonium acétate,
- Tf : taux de fonctionnalisation,
- TFA : acide trifluoroacétique,
- THF : tétrahydrofurane,
- UV : ultraviolet.

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

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

Les conditions utilisées pour les analyses HPLC sont les suivantes (conditions 1):

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

Tableau 1 : Conditions utilisées pour les analyses HPLC

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Jeol Lambda 400 MHz ou un spectromètre Brüker Avance 500 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant pris comme référence interne ($CDCl_3$: 7,26 ppm ; DMSO-d6 : 2,49 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations ci-dessus : s, d, t, q, qu et m. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz).

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

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

<u>Exemple 1 :</u> Synthèse d'un dérivé de l'anhydride aza-isatoïque conjugué à un groupement d'intérêt

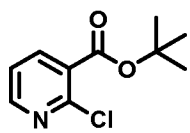
Introduction : Descriptif général de la synthèse des composés qui seront décrits dans l'exemple 1.

La conjugaison de l'anhydride aza-isatoïque ou de ses dérivés à un groupement d'intérêt suppose une réaction chimique entre l'anhydride aza-isatoïque, muni d'une fonction réactive, et la molécule d'intérêt, elle également étant munie d'une fonction réactive. A noter qu'il est particulièrement important de préserver l'intégrité de la partie anhydride aza-isatoïque durant ce couplage. L'homme du métier connaît une multitude de façon de conjuguer ainsi deux molécules entre elles afin d'obtenir une nouvelle molécule ayant des propriétés communes aux deux.

La stratégie choisie pour cette synthèse repose sur

l'iodination en position 6 de l'acide chloro nicotinique, protégé sous forme d'ester terbutylique **2**, pour obtenir le composé **4**. Cela permet ensuite l'introduction en position 6 d'un précurseur d'une fonction acide carboxylique (composé **5**), ladite fonction sera le point d'accroche pour l'introduction d'un bras de liaison et ensuite d'un groupement d'intérêt par le biais de couplages de type pseudo-peptidique. Dans une dernière étape, la formation de l'anhydride aza-isatoïque se fait par cyclisation intra moléculaire de l'amino ester *tert*-butylique **11 ou 12** en présence de phosgène, comme cela est bien représenté sur la **Figure 3.** Cette stratégie permet de travailler sur des précurseurs stables tout au long de la synthèse. L'anhydride aza-isatoïque, plus fragile, est synthétisé et purifié seulement à la fin. Dans le protocole permettant d'accéder directement à l'anhydride aza-isatoïque à partir de l'amino ester *tert*-butylique, généralement, la formation de l'anhydride était réalisée à partir de l'aza-anthranylate convenablement substitué. Enfin cette voie de synthèse est versatile et peut s'adapter à un très grand nombre de bras de liaison et de groupements d'intérêt ; le principal avantage résidant dans la possibilité d'utiliser un groupement d'intérêt ou un bras de liaison ou un de leurs précurseurs baso-labiles.

Exemple 1.1 : Synthèse du 2-Chloronicotinate de *tert*-butyle :



2

$C_{10}H_{12}NO_2Cl$

M=213,66 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, 5 g d'acide 2-chloronicotinique (31,73 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 100 mL de THF anhydre. Un volume de 5,37 mL de chlorure d'oxalyle (63,47 mmoles ; 2 éq), et cinq gouttes de DMF sont ajoutées successivement au milieu réactionnel à 0°C. Ce mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec et l'huile ainsi obtenue est alors dissoute dans 100 mL de THF anhydre. Une quantité de 4,27 g de tBuOK (38,08 mmoles, 1,2 éq) est alors ajoutée à -10°C, et le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 2h à température ambiante.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans 200 mL d'une solution aqueuse de K_2CO_3 à 5%, puis extrait avec du dichlorométhane (3×150 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées, et enfin évaporées. Le produit final est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 88% (5,97 g ; 27,94 mmoles).

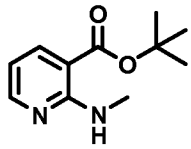
IR (KBr): ν 1732 (C=O), 1579, 1403, 1370, 1315, 1288, 1173, 1144, 1065, 1056 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ 1,62 (s, 9H); 7,31 (dd, 1H, ^3J = 7,8 Hz, ^3J = 4,4 Hz); 8,07 (dd, 1H, ^3J = 7,8 Hz, ^4J = 1,9 Hz); 7,31 (dd, 1H, ^3J = 4,4 Hz, ^4J = 1,9 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 28,0 (3C); 83,3; 122,0; 128,8; 139,8; 149,4; 151,2; 163,9.

HRMS (ESI) théorique $C_{10}H_{12}NO_2Cl$ $[M+H]^+$ 214,0635; expérimentale 214,0638.

Exemple 1.2 : Synthèse du 2-(Méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



3

$C_{11}H_{16}N_2O_2$

M=208,26 g/mole

Dans un tube scellé de 30 mL, 2,82 g de 2-chloronicotinate de *tert*-butyle **2** (13,20 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 4,6 mL de méthanol. Les 4,6 mL d'une solution aqueuse de méthylamine à 40% (53,26 mmoles ; 4 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. La réaction est laissée sous agitation magnétique à 100°C pendant 2 heures.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans 75 mL d'eau, puis extrait avec du dichlorométhane (3×75 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées, et enfin évaporées. L'huile obtenue est ensuite purifiée sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP puis EP/Et_2O 9,5:0,5). Le produit final est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 85% (2,35 g ; 11,28 mmoles).

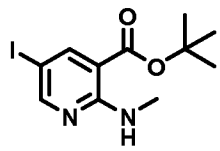
IR (KBr): ν 3380 (NH), 1684 (C=O), 1595, 1583, 1520, 1392, 1305, 1262, 1250, 1172, 1126 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,57 (s, 9H); 3,05 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 6,49 (dd, 1H, ^3J = 7,5 Hz, ^3J = 4,4 Hz); 7,98 (sl, 1H); 8,04 (dd, 1H, ^3J = 7,5 Hz, ^4J = 2,0 Hz); 8,28 (dd, 1H, ^3J = 4,4 Hz, ^4J = 2,0 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,8; 28,2 (3C); 81,2; 107,5; 110,4; 139,9; 153,0; 159,3; 167,1.

HRMS (IE) théorique $C_{11}H_{16}N_2O_2$ $[M]^+$ 208,1212; expérimentale 208,1213.

Exemple 1.3 : Synthèse du 5-Iodo-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



4

$C_{11}H_{15}IN_2O_2$

M=334,15 g/mole

Dans un ballon de 100 mL, 4,5 g de 2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle **3** (21,61 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 30 mL d'un mélange dichlorométhane / acide acétique (6:1). 5,83 g de N-iodosuccinimide (25,93 mmoles ; 1,2 éq) sont ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante. La réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes.

Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé avec 7 mL d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium, repris dans 100 mL d'une solution aqueuse de K_2CO_3 à 5%, puis extrait avec du dichlorométhane (3×100 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées, et enfin évaporées. Le solide obtenu est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP puis EP/Et_2O 9:1). Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 96% (6,92 g ; 20,71 mmoles).

Pf: 101°C.

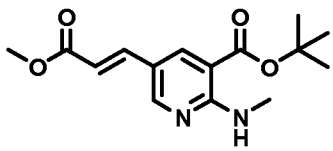
IR (KBr): ν 3371 (NH), 1679 (C=O), 1588, 1569, 1505, 1367, 1307, 1243, 1167, 1140, 1107, 796 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,57 (s, 9H); 3,01 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 7,97 (sl, 1H); 8,21 (d, 1H, ^4J = 2,0 Hz); 8,40 (d, 1H, ^4J = 2,0 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,8; 28,2 (3C); 73,1; 82,0; 109,8; 146,8; 157,9; 158,3; 166,0.

HRMS (IE) théorique $C_{11}H_{15}N_2O_2I$ $[M]^+$ 334,0179; expérimentale 334,0167.

Exemple 1.4 : Synthèse du 5-[(*1E*)-3-méthoxy-3-oxoprop-1-èn-1-1yl]-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



5

$C_{15}H_{20}N_2O_4$

M=292,33 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, 394 mg de triphénylphosphine (1,50 mmoles ; 0,1 éq), 168 mg d'acétate de palladium (0,75 mmoles ; 0,05 éq) et 2,08 mL de triéthylamine (14,96 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 50 mL de dioxane préalablement dégazé sous azote. Le mélange est laissé sous agitation magnétique à 100°C pendant 5 minutes. Les 5 g du dérivé iodé **4** (14,96 mmoles ; 1 éq) et 6,74 mL d'acrylate de méthyle (74,82 mmoles ; 5 éq) sont alors ajoutés et la réaction est laissée sous agitation magnétique à 100°C pendant 4 heures.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans 50 mL de dichlorométhane puis filtré sur célite. Le volume de 200 mL d'eau est ajouté et le mélange est extrait avec du dichlorométhane (3×150 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre,

filtrées, et enfin évaporées. Le solide obtenu est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/Et_2O 7:3). Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 76% (3,33 g ; 11,39 mmoles).

Pf: 114°C.

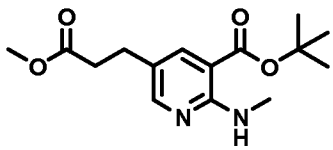
IR (KBr): ν 3373 (NH), 1720 (C=O), 1693 (C=O), 1634, 1604, 1585, 1526, 1317, 1266, 1253, 1203, 1188, 1161, 1134 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,59 (s, 9H); 3,09 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 3,80 (s, 3H); 6,27 (d, 1H, ^3J = 15,8 Hz); 7,59 (d, 1H, ^3J = 15,8 Hz); 8,22 (d, 1H, ^4J = 2,4 Hz); 8,30 (sl, 1H); 8,41 (d, 1H, ^4J = 2,4 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 28,0; 28,2 (3C); 51,5; 82,1; 107,7; 113,7; 117,6; 138,2; 141,2; 153,9; 159,6; 166,5; 167,6.

HRMS (IE) théorique $C_{15}H_{20}N_2O_4$ $[M]^+$ 292,1423; expérimentale 292,1413.

Exemple 1.5 : Synthèse du 5-(3-méthoxy-3-oxopropyl)-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



6

$C_{15}H_{22}N_2O_4$

M=294,35 g/mole

Dans un ballon de 500 mL, 6 g du dérivé vinylique **5** (20,52 mmoles ; 1éq) sont mis en solution dans 250 mL d'acétate d'éthyle. 2,1 g de Pd/C sont ajoutés et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante sous un flux d'hydrogène pendant 24 heures.

Le mélange réactionnel est filtré sur Büchner puis sur célite, et enfin évaporé à sec. Le solide obtenu est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (EP à EP/Et_2O 7:3). Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 81% (4,88 g ; 16,58 mmoles).

Pf: 69°C.

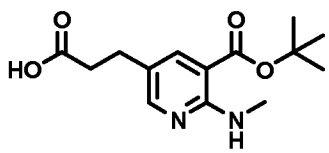
IR (KBr): ν 3392 (NH), 1736 (C=O), 1690 (C=O), 1574, 1520, 1371, 1227, 1194, 1173, 1156, 1127, 1090, 802 cm^{-1}.

RMN ^1H (400MHz, $CDCl_3$): δ 1,57 (s, 9H); 2,58 (t, 2H, ^3J = 7,8 Hz); 2,82 (t, 2H, ^3J = 7,8 Hz); 3,03 (d, 3H, ^3J = 4,9Hz); 3,68 (s, 3H); 7,85 (sl, 1H); 7,87 (s, 1H); 8,14 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,1; 27,9; 28,2 (3C); 35,8; 51,7; 81,4; 107,3; 122,0; 139,7; 152,7; 158,2; 167,0; 173,1.

HRMS (ESI) théorique $C_{10}H_{22}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 295,1658; expérimentale 295,1655.

Exemple 1.6 : Synthèse de l'Acide 3-{5-[(*tert*-butoxy)carbonyl]-6-(méthylamino)pyridin-3-yl}propanoïque:



7

$C_{14}H_{20}N_2O_4$

M=280,32 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, 4,87 g du dérivé **6** (16,54 mmoles ; 1éq) sont mis en solution dans 50 mL de tétrahydrofurane. Les 50 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium 1M (50 mmoles ; 3 éq) sont ajoutés et la réaction est laissée sous

agitation magnétique à température ambiante pendant 45 minutes.

Le mélange réactionnel est évaporé afin d'éliminer le tétrahydrofurane. Le pH de la solution aqueuse obtenue est ajusté à 6 avec de l'acide acétique. Cette solution est ensuite extraite avec de l'acétate d'éthyle (4×50 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre, filtrées, et enfin co-évaporées avec du toluène. Le produit final est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 92% (4,25 g ; 15,16 mmoles).

Pf: 106°C.

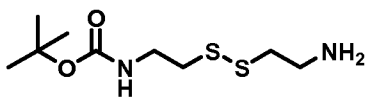
IR (KBr): ν 3374 (NH), 1713 (C=O), 1683 (C=O), 1584, 1538, 1367, 1342, 1304, 1282, 1245, 1192, 1169, 1139, 1101, 801 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ 1,57 (s, 9H); 2,62 (d, 2H, ^{3}J = 7,8 Hz); 2,85 (t, 2H, ^{3}J = 7,8 Hz); 3,02 (t, 3H, ^{3}J = 4,9 Hz); 7,92 (d, 1H, ^{4}J = 2,0 Hz); 7,95 (sl, 1H); 8,20 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,0; 28,1; 28,2 (3C); 35,9; 81,6; 107,8; 122,2; 140,5; 152,6;157,9; 166,8; 177,0.

HRMS (ESI) théorique $C_{14}H_{20}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 281,1501; expérimentale 281,1500.

Exemple 1.7 : Synthèse du N-{2-[(2-Aminoéthyl) disulfanyl]éthyl}carbamate de *tert*-butyle :



8

$C_9H_{20}N_2O_2S_2$

M=252,40 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, 6 g de cystamine (26,64 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 50 mL de méthanol. Une solution

de 5,814 g de Boc_2O (26,64 mmoles ; 1 éq) et 11,14 mL de TEA (79,12 mmoles ; 3 éq) dans 40 mL de méthanol, est alors ajoutée goutte à goutte à la solution de cystamine pendant 45 minutes, sous agitation magnétique à température ambiante.

Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec jusqu'à l'obtention d'un solide blanc. Le solide obtenu est repris dans 70 mL d'une solution de NaH_2PO_4 1M. Le mélange est ensuite extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 90 mL). La phase aqueuse est alcalanisée à pH 9 à l'aide d'une solution de NaOH 1M. Le mélange est alors extrait avec de l'acétate d'éthyle (6 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ puis évaporées sous vide.

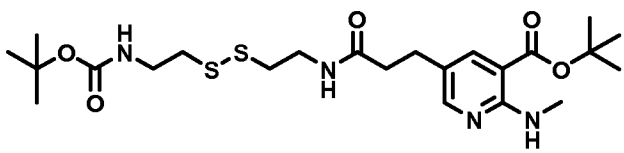
Le produit est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 42% (2,82 g ; 11,19 mmoles).

IR (KBr): ν 3356 (NH), 2976, 2930, 1694 (CO), 1517, 1392, 1366, 1275, 1253, 1170 cm^{-1}.

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,45 (s, 9H); 1,75 (s, 2H); 2,78 (m, 4H); 3,03 (m, 2H, J=5Hz); 3,46 (m, 2H); 5,01 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 38,1; 39,2; 40,1; 41,3; 79,4; 155,7.

Exemple 1.8 : Synthèse du 5-[2-({2-[(2-{[(*tert*-Butoxy) carbonyl]amino}éthyl)disulfanyl]éthyl}carbamoyl)éthyl]-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



9

$C_{23}H_{38}N_4O_5S_2$

M=514,7 g/mole

Dans un ballon de 250 mL, 3 g du dérivé acide **7** (10,70 mmoles ; 1 éq) ; 3,08 g d'EDC (16,06 mmoles ; 1,5 éq) et 2,17 g d'HOBt (16,06 mmoles ; 1,5 éq) sont mis en solution dans 50 mL de dichlorométhane. Après 10 minutes à température ambiante, 2,97 g du dérivé aminé **8** sont alors ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2 heures.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans 75 mL d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (4×75 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre et filtrées. Le solide obtenu est ensuite purifié sur une colonne de gel de silice en utilisant un gradient d'éluant (DCM/AcOEt 8/2 à DCM/AcOEt 2/8). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 94% (5,2 g ; 10,10 mmoles).

Pf: 106°C.

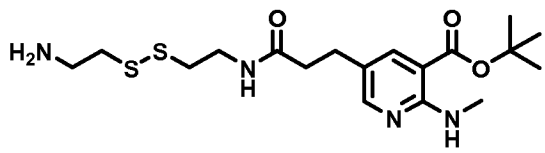
IR (KBr): ν 3385 (NH), 3338 (NH), 3275 (NH), 1682 (C=O), 1654 (C=O), 1569, 1547, 1538, 1511, 1389, 1366, 1303, 1289, 1253, 1229, 1165, 1126 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$): δ 1,43 (s, 9H); 1,57 (s, 9H); 2,47 (t, 2H, ^{3}J = 7,5 Hz); 2,74 (t, 2H, ^{3}J = 6,8 Hz); 2,83 (m, 4H); 3,03 (d, 3H, ^{3}J = 4,9Hz); 3,42 (q, 2H, ^{3}J = 6,4 Hz); 3,55 (q, 2H, ^{3}J = 5,8 Hz); 5,03 (sl, 1H); 6,51 (sl, 1H); 7,84 (sl, 1H); 7,87 (d, 1H, ^{4}J = 1,3 Hz); 8,14 (d, 1H, ^{4}J = 1,3 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,9 (2C); 28,2 (3C); 28,3 (3C); 37,4; 38,0; 38,3; 38,5; 39,5; 79,7; 81,3; 107,2; 122,4; 139,8; 152,8; 155,9; 158,2; 167,0; 172,2.

HRMS (ESI) théorique $C_{23}H_{38}N_4O_5S_2$ $[M+H]^+$ 515,2362; expérimentale 515,2342.

Exemple 1.9 : Synthèse du 5-[2-({2-[(2-Aminoéthyl)disulfanyl]éthyl}carbamoyl)éthyl]-2-(méthylamino) nicotinate de *tert*-butyle :



10

$C_{18}H_{30}N_4O_3S_2$

M=414,59 g/mole

Dans un ballon de 100 mL sous azote, 2 g du dérivé **9** (3,89 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 15 mL de dichlorométhane. 5 mL d'acide trifluoroacétique (65,29 ; 16,8 éq) sont ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans 50 mL d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium, puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (4×50 mL). Les phases organiques sont alors rassemblées, lavées avec de l'eau (2×50 mL), séchées sur du sulfate de sodium anhydre et filtrées. Le produit final est obtenu sous forme d'huile avec un rendement quantitatif (1,6 g ; 3,86 mmoles).

IR (KBr): ν 3378 (NH), 2977, 2931, 1682 (CO), 1612, 1578, 1520, 1368, 1304, 1228, 1160, 1131, 1095, 910, 732 cm^{-1}.

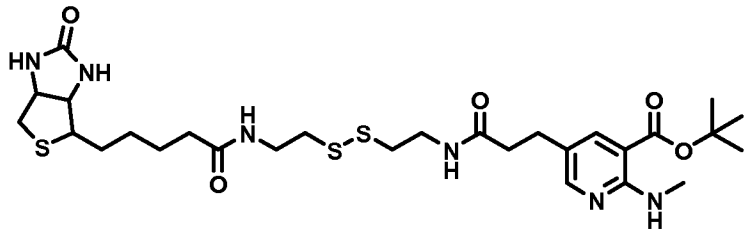
RMN ^1H (400MHz, $CDCl_3$): δ 1,58 (s, 9H); 1,64 (sl, 2H); 2,42 (t, 2H, ^3J = 7,6 Hz); 2,76 (t, 4H, ^3J = 6,1 Hz); 2,84 (t, 4H, ^3J = 7,6 Hz); 3,03 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 3,03 (m, 2H); 3,58 (q, 2H, ^3J = 6,1 Hz); 6,00 (sl, 1H); 7,84 (sl, 1H); 7,87 (d, 1H, ^4J = 2,4 Hz); 8,14 (d, 1H, ^4J = 2,4 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 27,7; 27,8; 28,1 (3C); 37,4; 37,9; 38,3; 40,3; 41,9; 81,3; 107,1; 122,2; 139,7; 152,5; 158,0;

166,8; 171,9.

HRMS (ESI) théorique $C_{18}H_{30}N_4O_3S_2$ $[M+H]^+$ 415,1838; expérimentale 415,1821.

Exemple 1.10 : Synthèse du 5-[2-({2-[(2-{5-[(3aS,6aR)-2-oxo-Hexahydro-1H-thieno[3,4-*d*]imidazolidin-4-yl]pentanamido}éthyl) disulfanyl]éthyl}carbamoyl)éthyl]-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



11

$C_{28}H_{44}N_6O_5S_3$

M=640,88 g/mole

Dans un ballon de 100 mL, 500 mg du dérivé amino **10** (1,21 mmoles, 1 éq) sont mis en solution dans 20 mL de diméthylformamide anhydre. 412 mg de Biot-CONHS (**15**, 1,21 mmoles ; 1 éq) et 168 µL de triéthylamine (1,21 mmoles ; 1 éq) sont ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 heure.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H_2O à H_2O/ACN 3/7). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 70% (545 mg ; 0,85 mmoles).

Pf: 108°C.

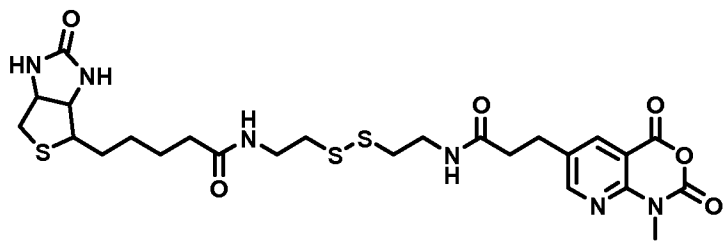
IR (KBr): ν 3297 (NH), 3074, 2928, 2853, 1704 (CO), 1683 (CO), 1642 (CO), 1613, 1578, 1520, 1226, 1159, 1094, 803, 727, 597 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-*d6*): δ 1,42 (m, 2H); 1,57 (s, 9H); 1,60-1,73 (m, 4H); 2,23 (td, 2H, ^4J = 2,9 Hz, ^3J = 7,2 Hz,); 2,47 (t, 2H, ^3J = 7,5 Hz); 2,71 (d, 1H, ^2J = 12,8 Hz); 2,78-2,88 (m, 6H); 2,89 (dd, 1H, ^3J = 4,9 Hz, ^2J = 12,8 Hz); 3,01 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 3,10-3,15 (m, 1H); 3,50-3,54 (m, 4H); 4,30 (dd, 1H, ^3J = 4,5 Hz, ^3J = 7,5 Hz); 4,50 (dd, 1H, ^3J = 4,9 Hz, ^3J = 7,5 Hz); 5,71 (sl, 1H); 6,58 (sl, 1H) ; 6,85 (t, 1H, ^3J = 5,8 Hz); 7,09 (t, 1H, ^3J = 5,8 Hz); 7,83 (q, 1H, ^3J = 4,9 Hz); 7,88 (d, , 1H ^4J = 2,4 Hz); 8,14 (d, 1H, ^4J = 2,4 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d6*): δ 25,6; 27,9; 27,9; 28,0; 28,1; 28,3 (3C); 35,7; 37,6; 38,0; 38,2; 38,4; 38,5; 40,6; 55,7; 60,2; 61,7; 81,5; 107,4; 122,6; 140,0; 152,6; 158,2; 164,1; 167,0 ; 172,6; 173,8.

HRMS (ESI) théorique $C_{28}H_{44}N_6O_5S_3$ $[M+H]^+$ 641,2614; expérimentale 641,2626.

Exemple 1.11 : Synthèse du 5-[(3aS,6aR)-2-oxo-Hexahydro-1H-thiéno[3,4-d]imidazolidin-4-yl]-N-(2-{[2-(3-{1-méthyl-2,4-dioxo-*1H,2H,4H*-pyrido[2,3-*d*][1,3]oxazin-6-yl}propanamido) éthyl]disulfanyl}éthyl)pentanamide :



12

$C_{25}H_{34}N_6O_6S_3$

M=610,77 g/mole

Dans un tube scellé de 30 mL, 500 mg du dérivé **11** (0,78 mmoles ; 1éq) sont mis en solution dans 20 mL d'éther diéthylique. 1,23 mL d'une solution de phosgène à 20% dans le toluène (2,34 mmoles ; 1éq) et 325 µL de triéthylamine (2,34 mmoles ; 3éq) sont ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H_2O à H_2O/ACN 4/6). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 42% (200 mg ; 0,33 mmoles).

Pf: 125°C.

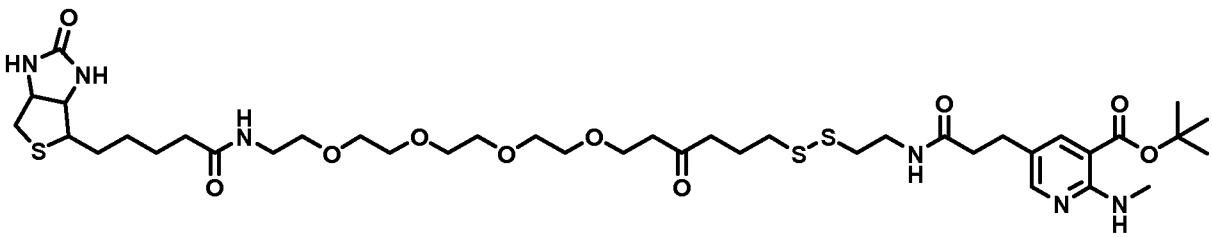
IR (KBr): ν 3299 (NH), 2927, 1785 (CO), 1735 (CO), 1704 (CO), 1641 (CO), 1612, 1488, 1326, 1232, 1179, 1069, 1045, 979, 787, 745, 674 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-*d6*): δ 1,24-1,34 (m, 2H); 1,41-1,59 (m, 4H); 2,05 (t, ^3J = 7,4 Hz, 2H); 2,44 (t, 2H, ^3J = 7,4 Hz); 2.56 (d, 1H, ^2J = 12,4 Hz); 2,68-2,73 (m, 4H); 2,80 (dd, 1H, ^3J = 5,0 Hz, ^2J = 12,4 Hz); 2,90 (t, 2H, ^3J = 7,4 Hz); 3,26-3,29 (m, 4H); 3,47 (s, 3H); 4,11 (m, 1H); 4,28 (m, 1H); 6,35 (sl, 1H); 6,41 (sl, 1H); 7,97 (t, 1H, ^3J = 5,5 Hz); 8,06 (t, 1H, ^3J = 5,5 Hz); 8,21 (d, 1H, ^4J = 2,2 Hz); 8,62 (d, 1H, ^4J = 2,2 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d6*): δ 25,2; 26,9; 27,9; 28,1; 29,9; 35,1; 36,0; 37,2 (2C); 37,8; 37,8; 39,8; 55,4; 59,2; 61,0; 107,2; 132,7; 137,8; 147,7; 150,9; 155,4; 158,4; 162,7; 170,9; 172,2.

HRMS (ESI) théorique $C_{25}H_{34}N_6O_6S_3$ $[M+H]^+$ 611,1780; expérimentale 611,1777.

Exemple 1.12 : Synthèse du 5-{2-[(2-{[2-(1-{5-[(3aS,6aR)-2-oxo-Hexahydro-*1H*-thiéno[3,4-d]imidazolidin-4-yl]pentanamido}-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-amido)éthyl]disulfanyl}éthyl) carbamoyl]ethyl}-2-(méthylamino)nicotinate de *tert*-butyle :



13

$C_{39}H_{65}N_7O_{10}S_3$

M=888,17 g/mole

Dans un ballon de 100 mL, 400 mg du dérivé amino **10** (0,965 mmoles ; 1éq) sont mis en solution dans 15 mL de dichlorométhane. 635 mg de Biot-peg$_4$-COPFP (0,965 mmoles ; 1éq, QuantaBioDesign, Powell, USA) et 134 µL de triéthylamine (0,965 mmoles ; 1éq) sont ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 45 minutes.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H_2O à H_2O/ACN 4/6). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 85% (730 mg ; 0,822 mmoles).

IR (KBr): ν 3400 (NH), 2925, 1681 (CO), 1644 (CO), 1579, 1525, 1157, 1124, 804, 618 cm^{-1}.

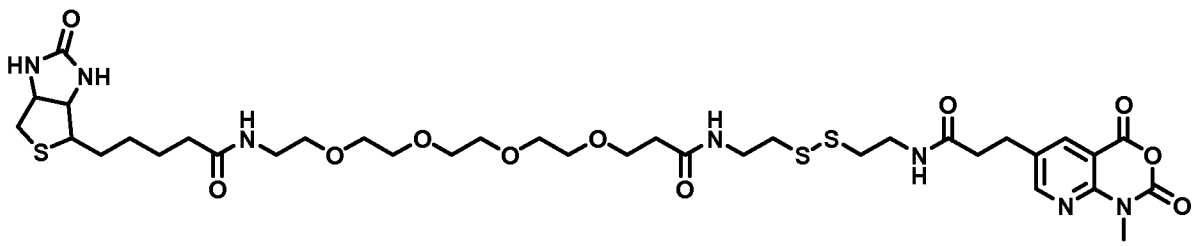
RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-*d6*): δ 1,40-1,46 (m, 2H); 1,57 (s, 9H); 1,61-1,78 (m, 4H); 2,22 (t, 2H, ^3J = 7,1 Hz); 2,46-2,49 (m, 4H); 2,73 (d, 1H, ^2J = 12,7 Hz); 2,77-2,83 (m, 6H); 2,90 (dd, ^3J = 5,0 Hz, 1H, ^2J = 12,7 Hz); 3,02 (d, 3H, ^3J = 4,9 Hz); 3,13 (m, 1H); 3,39-3,44 (m, 2H); 3,52-3,55 (m, 6H); 3,62-3,63 (m,

12H); 3,72 (t, 2H, ^3J = 5,9 Hz); 4,31 (m, 1H); 4,50 (m, 1H); 5,41 (sl, 1H); 6,33 (sl, 1H); 6,85 (t, 1H, ^3J = 5,5 Hz); 6,95 (t, 1H, ^3J = 5,6 Hz); 7,28 (t, 1H, ^3J = 5,8 Hz); 7,82 (q, 1H, ^3J = 4,9 Hz); 7,88 (d, 1H, ^4J = 2,5 Hz); 8,14 (d, 1H, ^4J = 2,5 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d6*): δ 24,6; 26,9; 26,9; 27,1; 27,1; 27,3 (3C); 34,8; 35,8; 36,2; 37,2; 37,3; 37,4; 37,5; 38,2; 39,5; 54,5; 59,1; 60,8; 66,2; 68,9; 69,0; 69,2; 69,3; 69,5 (3C); 80,4; 106,3; 121,7; 138,9; 151,8; 157,2; 162,7; 166,1; 171,0; 171,5; 172,3.

HRMS (ESI) théorique $C_{39}H_{65}N_7O_{10}S_3$ $[M+H]^+$ 888,4033; expérimentale 888,4020.

Exemple 1.13 : Synthèse du 1-{5-[(3aS,6aR)-2-oxo-hexahydro-1H-thiéno[3,4-d]imidazolidin-4-yl]pentanamido}-N-(2-{[2-(3-{1-méthyl-2,4-dioxo-*1H,2H,4H*-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin-6-yl}propanamido)éthyl]disulfanyl}éthyl)-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-amide :



14

$C_{36}H_{55}N_7O_{11}S_3$

M=858,06 g/mole

Dans un tube scellé de 30 mL, 200 mg du dérivé **13** (225 µmoles ; 1 éq) préalablement adsorbé sur 500 mg de silice greffée C18, sont mis en solution dans 20 mL d'éther diéthylique. 355 µL d'une solution de phosgène à 20% dans le toluène (675 µmoles ; 1 éq) et 94 µL de triéthylamine (675

µmoles ; 3 éq) sont ajoutés, et la réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes.

Le mélange réactionnel est évaporé à sec et directement purifié sur une colonne de gel de silice greffée C18, en utilisant un gradient d'éluant (H_2O à H_2O/ACN 4/6). Le produit final est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 26% (50 mg ; 58,2 µmoles).

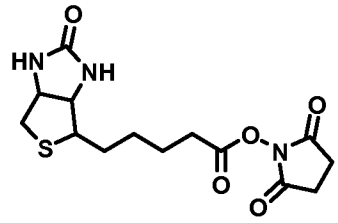
IR (KBr): ν, 3426 (NH), 2926, 2875, 1782 (CO), 1729 (CO), 1641 (CO), 1550, 1490, 1369, 1330, 1093, 788, 746, 677 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-*d6*): δ 1,41-1,47 (m, 2H); 1,58-1,78 (m, 4H); 2,23 (t, 2H, ^3J = 7,4 Hz); 2,49 (t, 2H, ^3J = 5,7 Hz); 2,64 (t, 2H, ^3J = 7,2 Hz); 2,75 (m, 3H); 2,78 (t, 2H, ^3J = 5,9 Hz); 2,91 (dd, 1H, ^3J = 4,9 Hz, ^2J = 12,5 Hz); 3,05 (t, 2H, ^3J = 7,2 Hz); 3,15 (m, 1H); 3,39-3,45 (m, 2H); 3,46-3,51 (m, 4H); 3,56 (t, 2H, ^3J = 5,0 Hz); 3,63-3,64 (m, 12H); 3,66 (s, 3H); 3,74 (t, 2H, ^3J = 5,7 Hz); 4,33 (m, 1H); 4,52 (m, 1H); 5,51 (sl, 1H); 6,37 (sl, 1H); 6,90 (t, 1H, ^3J = 5,4 Hz); 7,38 (t, 1H, ^3J = 5,7 Hz); 7,49 (t, 1H, ^3J = 5,7 Hz); 8,29 (d, 1H, ^4J = 2,2 Hz); 8,60 (d, 1H, ^4J = 2,2 Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d6*): δ 24,6; 26,7; 27,0; 27,1; 29,4; 34,8; 35,6; 35,7; 35,8; 37,1; 37,6; 37,7; 38,2; 39,5; 54,5; 59,2; 60,8; 64,8; 66,2; 68,9; 69,0; 69,1; 69,2; 69,4 (2C); 105,8; 132,3; 137,7; 146,8; 150,1; 155,5; 157,1; 162,8; 170,8; 171,2; 172,4.

HRMS (ESI) théorique $C_{35}H_{56}N_7O_{11}S_3$ $[M+H]^+$ 858,3200; expérimentale 858,3185.

Exemple 1.14 : Synthèse de Biot-CONHS :



15

$C_{14}H_{19}N_3O_5S$

M=341,38 g/mole

Dans un ballon de 100 mL, 2,5 g de D-Biotine (10,23 mmoles ; 1éq) et 1,18 g de N-hydroxysuccinimide (10,23 mmoles ; 1 éq) sont mis en solution dans 40 mL de diméthylformamide anhydre. La réaction est laissée sous agitation magnétique à 70°C jusqu'à solubilisation complète des réactifs. 2,55 g d'EDC (13,30 mmoles ; 1,3 éq) sont ensuite ajoutés, et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12h.

Le mélange est évaporé à sec puis repris dans 30 mL de méthanol. Le précipité obtenu est alors filtré sur fritté, puis lavé avec du MeOH (3x30 mL) et de l'éther diéthylique (3x90 mL).

Le produit est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 70% (2,46 g ; 7,21 mmoles).

Pf: 210°C.

IR (KBr): ν 3234; 1820; 1789; 1747 (CO); 1730 (CO); 1705 (CO); 1216; 1072 cm^{-1}.

RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 1,39-1,67 (m, 6H); 2,57 (m, 1H); 2,66 (t, 2H, ^3J=7,3Hz); 2,68 (s, 4H); 2,84 (m, 1H); 3,09 (m, 1H); 4,14 (m, 1H); 4,29 (m, 1H); 6,37 (s, 1H); 6,43 (s, 1H).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): δ 24,3; 25,5 (2C); 27,6; 27,9; 30,0; 39,9; 55,3; 59,1; 61,0; 162,8; 169,0; 174,4 (2C).

Résultats et conclusion : On démontre dans cet exemple que la synthèse d'un dérivé aza-isatoïque doté d'un groupement d'intérêt est réalisable.

Exemple 2 : Démonstration de la stabilité en solution d'un composé aza-isatoïque doté d'un groupement d'intérêt :

Objectif : Plusieurs tests destinés à vérifier et démontrer la stabilité chimique du dérivé aza-isatoïque **14** par rapport au composé de référence Biot-peg$_4$-SS-IAMe tel que décrit dans la demande FR 1060102, ont été effectués. Ces tests comparatifs ont été réalisés en solution dans le DMSO à température ambiante et à 4°C.

Mode opératoire : Pour chaque dérivé isatoïque, deux solutions à 120 mM dans le DMSO ont été préparées et stockées respectivement, à température ambiante et à +4°C pendant deux semaines. Pour chacune des solutions, trois analyses LC-MS (condition 1) ont été effectuées à t = 0, t = 4 jours et t = 7 jours. Pour chaque analyse, la pureté du composé est déterminée en UV PDA Max Plot, par intégration du pic correspondant au dérivé isatoïque ainsi que les éventuels pics correspondants aux produits de dégradation. La **Figure 4** présente les résultats obtenus.

Résultats et conclusion : Les résultats obtenus montrent que les deux dérivés isatoïques ne se dégradent pas dans le temps. Aucun produit de dégradation n'a été mis en évidence au cours de ces expériences. Ils sont donc stables en solution dans le DMSO, non seulement à 4°C mais aussi à température ambiante, pendant au moins 7 jours. Nous avons ainsi démontré le maintien de la stabilité chimique en série aza-isatoïque.

L'homme du métier aurait pu penser que la molécule aza-isatoïque en étant plus réactive serait donc moins stable. Or de façon surprenante, l'exemple 2 démontre qu'il n'en est rien, bien au contraire la molécule reste parfaitement stable dans le temps à température ambiante tout en étant plus réactive (voir également l'exemple 3 qui traite du marquage).

Exemple 3 : Démonstration de la réactivité à température ambiante d'un composé aza-isatoïque, vis-à-vis d'un oligoribonucléotide (ORN) modèle de 27 bases - Mesure du taux de fonctionnalisation :

Objectif : Afin de démontrer l'augmentation de la réactivité en série aza-isatoïque des tests comparatifs de fonctionnalisation d'ORN 27 mers à température ambiante et à 65°C ont été menés pour le dérivé isatoïque de référence, Biot-peg$_4$-SS-IAMe et pour le dérivé aza-isatoïque, Biot-peg$_4$-SS-azaIAMe (**14**).

Une comparaison de la réactivité du dérivé anhydride aza-isatoïque **14** par rapport au dérivé isatoïque de référence, Biot-peg$_4$-SS-IAMe tel que décrit dans WO-A-2012/076794, vis-à-vis d'un ORN modèle de 27 bases (seq : 5'-AAC-CGC-AGU-GAC-ACC-CUC-AUC-AUU-ACA-3', Eurogentec, Liège Science Park, Belgique) est effectuée. Pour cela une quantité fixe d'ORN est mise en réaction avec un dérivé anhydride isatoïque conjugué à une molécule d'intérêt, à 65°C et à température ambiante. Un suivi de la réaction par HPLC à 260 nm est réalisé comme cela a été décrit auparavant dans la demande de brevet WO-A-2012/076794 dans l'exemple 3. Cette analyse permet de détecter la disparition du pic correspondant à l'ORN initial et l'apparition de pics correspondants à l'ORN acylé. Ces

produits possèdent un temps de rétention supérieur, et un spectre d'absorption correspondant à la fois à celui de l'ORN, et à celui du réactif de fonctionnalisation.

Pour évaluer précisément le taux de fonctionnalisation (Tf), la population d'ORN (marquée et non marquée) est séparée de l'excès de marqueur par précipitation à l'acétone/perchlorate de lithium. Puis, les ORN ainsi obtenus sont soumis à une hydrolyse à la nucléase P1 (Aldrich, Saint Louis, USA) et à la phosphatase alcaline (Aldrich, Saint Louis, USA) afin d'hydrolyser les liaisons phosphate diester de l'ORN.

Une analyse LC-MS de ce mélange permet alors de caractériser et d'identifier plusieurs populations :

- les ribonucleosides non marqués
- les adduits mono-nucléosidiques marqués qui se différencient très nettement par un temps de rétention plus élevé, et par un spectre UV caractéristique des acides nucléiques et du réactif de fonctionnalisation.
- des dinucléotides acylés en 2' qui en raison du groupement antranylate substitué par le groupement d'intérêt en 2', ne peuvent être clivés par la nucléase P1.
- des trinucléotides ou quadrinucléotides 2'OH per-acylés qui peuvent théoriquement se former mais qui sont statistiquement très peu représentés (car il faudrait alors qu'il y ait deux ou trois acylations du 2'OH consécutives), ne sont pas recherchés.

A noter que le dérivé 5'-O-acylé n'est que très peu représenté et n'est pas visible, comme décrit par Servillo (Eur. J.Biochem. 1993 583-589).

Le taux de fonctionnalisation de l'ORN (Tf) est évalué par la mesure :

- de l'aire correspondant aux adduits mono-nucléosidiques terminaux (fonctionnalisés en 2' et en 3') et de l'aire correspondant aux di-nucléotides acylés (fonctionnalisés en interne sur le 2'OH)
- comparée à l'aire des pics correspondant aux quatre ribonucléosides.

Mode opératoire : Dans une expérience type, l'équivalent de 8 nmoles d'un ORN de 27 bases (5'-AAC-CGC-AGU-GAC-ACC-CUC-AUC-AUU-ACA-3', Eurogentec, Liège Science Park, Belgique) en solution dans l'eau sont préalablement séchés à l'évaporateur centrifuge (RCT 60, Jouan, St Herblain, France) dans un tube Eppendorf en plastique de 2 mL. Le résidu sec obtenu est d'abord solubilisé dans 40 µL d'eau, puis 20 µl d'une solution tamponnée sont ajoutés (dans l'exemple une solution tampon de Triéthyl ammonium d'acétate, pH 7, 1M Aldrich, St Louis, USA réf :09748-100ml). Enfin, 20 µl d'une solution d'un dérivé de l'anhydride isatoïque à 120 mM dans le DMSO sont incorporée dans la solution précédente (soit la molécule de référence Biot-peg$_4$-SS-IAMe tel que décrit dans FR 1060102 ou le dérivé azaisatoïque Biot-peg$_4$-SS-azaIAMe (**14**) dans cet exemple). Le mélange est incubé 60 minutes à température ambiante ou à 65°C dans une étuve sur un portoir pré-équilibré en température. Pour éliminer les sels et l'excès de marqueur, le mélange est ensuite purifié par triple précipitation dans 1,2 mL d'un mélange Acétone/$LiClO_4$ 180 mM 75/25. Pour finir, le culot est séché à l'acétone et évaporé à l'évaporateur centrifuge (RCT 60, Jouan, St Herblain, France). Le résidu est alors repris dans 20 µl d'une solution H_2O/DMSO 85/15 et une injection HPLC (conditions 1) est pratiquée afin de vérifier l'absence de réactif de fonctionnalisation. 2 µl de nucléase P1 (réf. : N8630 Sigma-Aldrich, St Louis, USA) en solution à 1 U/µl dans

son tampon : acétate de sodium 20 mM pH 5,5; $ZnCl_2$ 1 mM; NaCl 50 mM, et 1 µl de phosphatase alcaline à 7 u/µl dans l'eau (Réf. P7923-2KU Sigma-Aldrich, St Louis, USA) sont introduits dans le mélange. Le milieu est laissé à température ambiante pendant 4 à 6 heures. Une injection est alors réalisée en HPLC (conditions 1) afin de vérifier l'hydrolyse totale de l'ORN et d'analyser la nature des fragments.

Le taux de fonctionnalisation est évalué en UV à 260 nm, par intégration des massifs correspondants aux dinucléotides acylés et aux nucléosides-acylés, par rapport aux massifs correspondant aux quatre ribonucléosides.

Remarque : Les valeurs de taux de fonctionnalisation, présentées dans le cadre de cette invention, ne tiennent pas compte du facteur de correction qu'il faut apporter en fonction du coefficient d'extinction molaire à 260 nm de chacun des nucléosides, qu'il s'agisse de nucléosides ou de dinucléotides.

La **Figure 5** présente les résultats obtenus lors des tests de fonctionnalisation sur des ORN 27 mers avec les dérivés Biot-peg_4-SS-IAMe, tel que décrit dans FR 1060102 et Biot-peg_4-SS-azaIAMe **14**, à température ambiante et à 65°C.

Discussion et conclusion : A 65°C, le taux de fonctionnalisation non corrigé a été évalué à 13,5% pour le dérivé aza-isatoïque **14** contre 7,5% pour le composé de référence, Biot-peg_4-SS-IAMe. La réactivité vis-à-vis d'un oligoribonucléotide a donc été augmentée d'un facteur 1,8 en série aza-isatoïque à 65°C. De façon plus intéressante, le dérivé aza **14** permet de fonctionnaliser l'ARN à température ambiante (Tf non corrigé = 7,8%), alors que le composé de référence est très peu réactif dans ces conditions (Tf non corrigé = 1%).

Avec cet exemple, nous démontrons l'augmentation de la réactivité vis-à-vis d'un ORN avec le dérivé aza-isatoïque **14**, ainsi que sa capacité à fonctionnaliser un ORN à température ambiante. On démontre aussi que pour une même concentration en réactif, on fonctionnalise un ORN avec le même Tf à température ambiante avec le dérivé aza-isatoïque qu'à 65°C avec le dérivé isatoïque.

Exemple 4 : Démonstration de la chémo-sélectivité de l'ARN par rapport à l'ADN en série aza-isatoïque :

Objectif : Afin de démontrer la sélectivité de fonctionnalisation de l'ARN vis-à-vis de l'ADN en série aza-isatoïque, un test comparatif a été effectué entre un ODN de 27 bases et un ORN de 27 bases mis en réaction avec un dérivé azaisatoïque, Biot-peg$_4$-SS-azaIAMe (**14**).

Mode opératoire : 8 nmoles d'ODN de 27 bases, Seq : 5'-AAC-CGC-AGT-GAC-ACC-CTC-ATC-ATT-ACA-3' (Eurogentec, Liège Science Park, Belgique) ou 8 nmoles d'un ORN de 27 bases, Seq : 5'-AAC-CGC-AGU-GAC-ACC-CUC-AUC-AUU-ACA-3' (Eurogentec, Liège Science Park, Belgique) sont mis en réaction avec le dérivé anhydride aza-isatoïque (**14**) à 30 mM dans un mélange DMSO/tampon TEAAc (250 mM pH 7) 25/75, pendant 1 heure à température ambiante. Après précipitation à l'acétone et hydrolyse avec la nucléase P1 et la phosphatase alcaline, les fragments hydrolysés sont analysés par LC-MS, comme décrit dans l'exemple 3. Un exemple des chromatogrammes de suivi de la réaction de l'ODN ou de l'ORN avec le composé **14**, est représenté sur la **Figure 6** où les tracés A, B et C correspondent respectivement à l'ORN initial, l'ORN fonctionnalisé avec le composé **14** et précipité, et l'ORN fonctionnalisé avec **14**, précipité et hydrolysé. Les tracés D, E et F représentent les mêmes résultats obtenus avec l'ODN.

Résultats et conclusion : Le taux de fonctionnalisation non corrigé de l'ORN est évalué à 7,8% avec le composé **14**, alors que celui de l'ODN est évalué à 0,5%. Dans ces conditions expérimentales, l'ODN est très peu fonctionnalisé. Ces résultats confirment la sélectivité de fonctionnalisation du dérivé de l'anhydride aza-isatoïque **14** pour l'ARN et l'absence de réactivité sur les bases. En effet, si les bases réagissaient sur le composé **14**, des adduits nucléosidiques anthranylates issus d'une réaction avec l'ODN seraient observés. A noter que les 0,5 % de fonctionnalisation de l'ODN proviennent d'une très faible réactivité des extrémités 5'-OH et 3'-OH de l'ADN (voir à ce propos Nawrot Nucleosides and Nucleotides 1998 815-829).

Cet exemple démontre une conservation de la chémo-sélectivité en série aza-isatoïque pour un ORN par rapport à un ODN. La présence de groupements 2'-OH spécifiques de l'ORN, est à l'origine de la réaction chémo-spécifique sur l'ORN.

Exemple 5 : Extraction sélective de transcrits ARN HIV à partir d'une solution contenant un mélange de transcrits ARN HIV et d'ADN génomique :

Objectif : Le but est de démontrer que le concept de l'enrichissement en ARN d'une solution biologique, contenant un mélange d'ARN et d'ADN en utilisant comme réactif de fonctionnalisation le dérivé azaisatoïque **14** à température ambiante est possible. Pour cela, deux modèles biologiques d'acides nucléiques ont été choisis, transcrits HIV pour l'ARN et ADN génomique de veau. Afin de comparer l'efficacité du dérivé azaisatoïque **14**, ces tests ont également été réalisés sur le composé de référence Biot-peg_4-SS-IAMe à 65°C et à température ambiante.

Mode opératoire : Les acides nucléiques utilisés dans cet exemple sont les suivants :

- Transcrits HIV WT 1500 bases, à 1,94 µg/µL.
- gDNA calf thymus, SIGMA (Saint Louis, USA), ref. D4764-5UN, à 1,92 µg/µL.

1 – Fonctionnalisation :

Dans trois tubes en plastique de 0,2 ml, les réactifs suivants sont introduits (Tableau 2 ci-dessous) :

Tests	Mélange Transcrits HIV/gDNA 1/9 à 2 µg/µL (en µL)	TEAAc 1M pH 7 (en µL)	Biot-peg$_4$-SS-IAMe à 6 mM / DMSO(en µL)	Biot-peg$_4$-SS-azaIAMe à 6 mM / DMSO (en µL)	Température
1	6	3	3	-	65°C
2	6	3	3	-	ta
3	6	3	-	3	ta

Tableau 2 : Récapitulatif des conditions expérimentales décrites dans l'exemple 5

Dans chaque cas, les concentrations finales en TEAAc et en réactif de fonctionnalisation sont respectivement de 250 mM et 1,5 mM.

Les trois tubes sont incubés pendant 1 heure à température ambiante ou à 65°C sur un portoir chauffant.

2 - Elimination de l'excès de réactif de fonctionnalisation par purification sur silice magnétique :

La purification des acides nucléiques pour chaque test a été réalisée dans 5 tubes différents de volume équivalent, afin de respecter les conditions optimales pour cette étape (soit 1 mg de silice magnétique pour 2 µg d'acides nucléiques). Ainsi, chaque essai est réparti dans cinq tubes Eppendorf de 1,5 mL soit 5 fois 2,1 µL (2 µg d'AN). Un volume de 900 µL de lysis buffer (tampon Easy Mag, réf. 280134, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et 50 µL de particules de silice magnétique (silice EasyMAG, réf. 280133, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sont ajoutés dans chaque tube. Ces derniers sont immédiatement agités par effet vortex après ajout de la silice, puis incubés 10 minutes à température ambiante. Après magnétisation sur aimant DYNAL, les surnageants sont éliminés par aspiration au moyen d'une pipette. Pour les étapes de lavage qui suivent, les tubes sont toujours agités par effet vortex et magnétisés pour enlever ensuite le surnageant. Un premier lavage est réalisé avec 500 µL de tampon de lavage 1 (tampon Easy Mag, réf. 280130, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Deux lavages sont ensuite effectués avec 900 µL puis 500 µL de tampon de lavage 2 (tampon Easy Mag, réf. 280131, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Enfin, une dernière étape de lavage est réalisée avec 500 µL de tampon d'élution 3 (tampon Easy Mag, réf. 280132, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à température ambiante. L'élution des acides nucléiques est effectuée avec 20 µL de tampon d'élution 3 mis sous agitation dans un agitateur chauffant (1400 rpm) à 70°C. Après 5 minutes, les tubes sont agités par effet vortex puis magnétisés pour récupérer les surnageants. Ces derniers sont dosés avec l'instrument Qubit® Fluorometer, réf. Q32857, Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis d'Amérique), et en utilisant les kits Quant-iT RNA Assay Kit 5-100 ng (réf. Q32855, Invitrogen, Carlsbad, California, Etats-Unis d'Amérique), et Quant-iT dsDNA HS Assay Kit 0,2-100 ng (réf. Q32854, Invitrogen, Carlsbad, California, Etats-Unis

d'Amérique). Ces kits de dosage permettent de déterminer un ratio ARN/ADN dans un mélange.

3 - Capture des acides nucléiques sur les particules magnétiques recouvertes de streptavidine :

Pour effectuer cette capture sur particules magnétiques, il est nécessaire de conserver chacun des essais divisés en 5 tubes dans l'étape de purification précédente. Les conditions optimales pour cette étape, c'est-à-dire l'emploi de 40 µg de particules magnétiques pour capturer totalement 2 µg d'acides nucléiques, sont ainsi respectées. Pour chaque essai, 8 µL (équivalent à 40 µg) de MagPrep P-25 Streptavidin, MERCK (Darmstadt, Allemagne) sont introduits au préalable dans 5 tubes en plastique de 0,2 ml. Ces particules sont lavées à deux reprises avec 80 µL de PBS 1X + SDS 0.1%, en utilisant des pointes effilées et l'aimant MPC 9600 Dynal Invitrogen (Carlsbad, California, Etats-Unis d'Amérique) pour les séparations magnétiques. Une fois les particules lavées, 15 µL d'acides nucléiques purifiés à l'étape 2 puis 5 µL de PBS 4X + SDS 0,4% sont ajoutés sur chaque culot. Les tubes sont incubés 10 minutes avec une agitation douce (agitateur par vortex à la vitesse minimum) à température ambiante. Après séparation magnétique, les surnageants sont récupérés à l'aide de pointes effilées. Ce surnageant est dosé comme précédemment avec le Qubit® Fluorometer.

4 - Elution des ARN fonctionnalisés :

Les culots de particules magnétiques de streptavidine, sur lesquels sont immobilisés les acides nucléiques fonctionnalisés, sont lavés avec 80 µL de PBS 1X + SDS 0,1% pendant 5 minutes à 65°C (portoir chauffant). Les différents essais sont agités par effet vortex et après 5 minutes, le

tampon de lavage est éliminé après séparation magnétique à l'aide de pointes effilées. Cette opération est répétée 2 fois. Un dernier lavage des culots est réalisé avec 20 µL de PBS 1X. Les 5 culots correspondant à chaque essai sont alors mélangés dans un seul tube. Le volume est alors de 100 µL de PBS 1X pour chaque essai. Ces derniers sont agités par effet vortex, puis le surnageant est éliminé après séparation magnétique à l'aide de pointes effilées. Chaque culot est mis en suspension dans 8 µL d'une solution de DTT à 100 mM dans le PBS 1X. Chaque essai est alors agité par effet vortex, puis incubé pendant 1 heure à 40°C, 300 RPM. Après séparation magnétique, le surnageant est récupéré à l'aide de pointes effilées. Ce surnageant est dosé avec l'instrument Qubit® Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, California, Etats-Unis d'Amérique) comme précédemment (environ 100 ng d'ARN sont recueillis).

Résultats et conclusions :

1 - Résultats :

Les dosages avec le Qubit® Fluorometer des éluats permettent de quantifier les acides nucléiques présents à chaque étape du processus comme décrit précédemment.

A partir des mesures obtenues, il est possible de calculer d'une part les rendements d'extraction d'ARN et d'ADN, et d'autre part un indice de sélectivité intermédiaire appelé S*. Cet indice nous permettra de comparer plusieurs essais réalisés avec différents dérivés isatoïques :

$$S^* = \frac{Rdt\ extraction\ ARN}{Rdt\ extraction\ ADN} = \frac{[ARN]_{final}/[ARN]_{purifiéàl'étape2}}{[ADN]_{final}/[ADN]_{purifiéàl'étape2}}$$

Remarque : L'évaluation de la sélectivité intermédiaire permet de ne pas tenir compte du biais qui serait apporté par l'étape

de purification n° 2. A partir des mesures obtenues et calculs réalisés, le Tableau 3 suivant est établi :

	Tag à 1,5 mM	Température de fonctionnalisation	Ratio ADN/ARN initial	Ratio ADN/ARN final	S*
Essai 1	Biot-peg4-SS-IAMe	65°C	90/10	14/86	6
Essai 2	Biot-peg4-SS-IAMe	ta	90/10	nd	nd
Essai 3	Biot-peg4-SS-azaIAMe	ta	90/10	4/96	30

Tableau 3 : Récapitulatif des ratios ADN/ARN mesurés aux étapes 2 et 4 du processus de fonctionnalisation/capture/clivage/élution de l'ARN

2 - Conclusion :

Le processus d'enrichissement en ARN, à partir d'une fonctionnalisation sélective de l'ARN avec le dérivé aza-isatoïque 14 et à température ambiante, est démontré. Le ratio ADN/ARN passe ainsi de 90/10 à l'issue de l'étape de purification, à un ratio de 4/96 après le processus complet (essai 3). Ce résultat démontre l'efficacité du dérivé azaisatoïque 14 à température ambiante pour l'extraction sélective d'ARN.

De plus, par rapport au composé de référence Biot-peg$_4$-SS-IAMe, ce dérivé permet d'enrichir le mélange en ARN en réalisant l'étape de fonctionnalisation à température ambiante. Enfin, la sélectivité intermédiaire est augmentée d'un facteur 5 à

température ambiante par rapport au composé de référence dans les mêmes conditions à 65°C.

Le dérivé aza-isatoïque 14 permet de fonctionnaliser les acides ribonucléiques à température ambiante, et par conséquent d'augmenter la sélectivité du processus d'extraction vis-à-vis de l'ARN.

Exemple 6 : Démonstration du concept de groupement auto immolable associé à un anhydride aza-isatoïque biotinylé. Synthèse d'un dérivé aza-isatoïque doté d'un groupement disulfure sur la partie aromatique

La synthèse d'un dérivé d'anhydride aza-isatoïque dont un exemple est décrit sur la **Figure 2** a été réalisée (BiotPE4(SSMe)PyrIAMe). Il est doté:

- d'un bras de liaison pourvu d'un lien dimethyle disulfure en position benzylique et en ortho de la fonction carbonyle
- d'un dérivé biotinylé en position benzylique.

Après réaction de ce dérivé avec un acide ribonucléique, le conjugué acide ribonucléique-aza-anthranylate qui se forme est soumis à un traitement au DDT, ce qui hydrolyse la liaison disulfure, le thiol généré réagit alors intra-moléculairement sur la fonction ester de l'aza-anthranylate par formation d'une aza-thiolactone très stable. Un acide ribonucléique nu exempt d'aza-anthranylate est alors libéré (**Figure 2**).

REVENDICATIONS

1. Procédé de fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), contenu dans un échantillon liquide, qui comprend les étapes suivantes :

a) disposer d'au moins :

- une molécule de liaison constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés,
- un groupement d'intérêt, et
- un bras de liaison reliant la molécule de liaison avec le groupement d'intérêt,

b) faire réagir la fonction anhydride de la molécule de liaison avec au moins un groupement hydroxyle porté :

- en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
- en position(s) 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide à l'extrémité 3' terminal de l'ARN, et

c) obtenir un aza-anthranylate reliant, à l'aide du bras de liaison, l'ARN au groupement d'intérêt.

2. Procédé de fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN) selon la revendication 1, ledit procédé étant un procédé de marquage d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), contenu dans un échantillon liquide, dans lequel ladite molécule de liaison est constituée par un anhydride aza-isatoïque ou un de ses dérivés possèdant une fluorescence intrinsèque, et dans lequel ledit groupement d'intérêt possède un signal de fluorescence intrinsèque mais différent du signal émis par la molécule de liaison, ou n'ayant pas de signal de fluorescence intrinsèque.

3. Procédé de fonctionnalisation d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN) selon la revendication 1, ledit procédé étant un procédé de capture ou de séparation d'au

moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), dans lequel lequel ledit groupement d'intérêt est constitué par un ligand complémentaire d'un anti ligand,
ledit procédé comprenant, postérieurement à l'étape c), l'étape suivante :

d) capturer ou séparer l'ARN par l'intermédiaire d'une réaction entre un ligand et un anti-ligand.

4. Procédé, selon la revendication 3, dans lequel il y a une étape supplémentaire consistant à :

e) réserver ou éliminer les molécules d'ARN ainsi capturées ou séparées et utiliser le reste de l'échantillon enrichi en ADN.

5. Procédé, selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel le bras de liaison est associé à la molécule de liaison avant que ledit bras de liaison soit associé au groupement d'intérêt.

6. Procédé, selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel le bras de liaison est associé à la molécule de liaison après que ledit bras de liaison est associé au groupement d'intérêt.

7. Procédé, selon l'une des revendications 5 ou 6, dans lequel la molécule de liaison est préalablement associée à l'ARN.

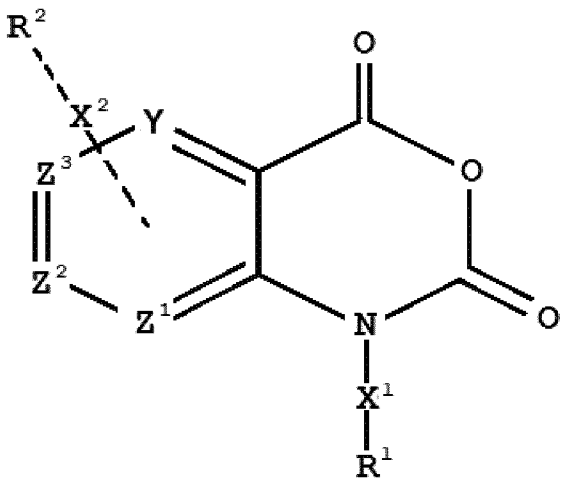
8. Procédé selon la revendication 3 ou 4, ou selon l'une des revendications 5 à 7 lorsqu'elles dépendent de la revendication 3 ou 4, ledit procédé étant un procédé de capture sélectif d'au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN), dans lequel ladite molécule de liaison se fixe par liaison covalente au niveau d'un groupement hydroxyle porté :

- en position 2' du ribose d'un des nucléotides de l'ARN, et/ou
- en position(s) 2' et/ou 3' du ribose du nucléotide terminal en position 3' de l'ARN.

9. Procédé de séparation de molécules d'ARN par rapport à d'autres constituants biologiques, notamment des molécules d'ADN consistant à :

- appliquer le procédé de capture, selon la revendication 8, à un échantillon biologique contenant des acides nucléiques indifférenciés (ARN et ADN), les groupements d'intérêt étant associés à au moins un support solide facilement séparable du reste de l'échantillon biologique, et
- séparer les molécules de liaison portant les molécules d'ARN du reste de l'échantillon biologique.

10. Réactif de fonctionnalisation, de formule (I) :



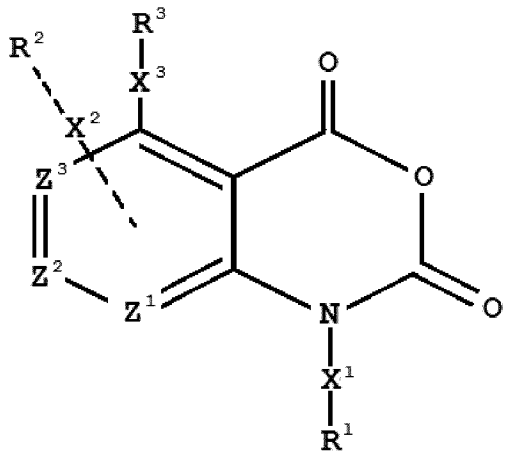
dans lequel :

- Y représente Z^4 ou le groupement $C\text{-}X^3\text{-}R^3$,
- R^1, R^2 et R^3 représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupement d'intérêt, sachant qu'au moins un des radicaux R^1, R^2 et R^3 représente un groupement d'intérêt, et
- le groupement d'intérêt est sélectionné parmi :

- un marqueur ou un précurseur de marquage, ou
- un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable,

- X^1, X^2 et X^3 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, des bras de liaison qui relient le groupement d'intérêt à la molécule de liaison,
- un seul des radicaux Z^1, Z^2, Z^3 et Z^4 est constitué par un atome d'azote (N), les autres radicaux sont constitués par un atome de carbone (C).

11. Réactif de fonctionnalisation selon la revendication 10, dans lequel Y représente le groupement $C\text{-}X^3\text{-}R^3$, ledit réactif répondant ainsi à la formule (2) suivante :



dans lequel :

- R^1, R^2 et R^3 représentent, indépendamment les uns des autres, H ou un groupement d'intérêt, sachant qu'au moins un des radicaux R^1, R^2 et R^3 représente un groupement d'intérêt, et
- le groupement d'intérêt est sélectionné parmi :
  - un marqueur ou un précurseur de marquage, ou
  - un ligand pouvant être reconnu par une molécule de reconnaissance ou une surface, ou une particule, etc., afin de former un complexe stable,

- X^1, X^2 et X^3 représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, des bras de liaison qui relient le groupement d'intérêt à la molécule de liaison,
- un seul des radicaux Z^1, Z^2 et Z^3 est constitué par un atome d'azote (N), les autres radicaux sont constitués par un atome de carbone (C).

12. Réactif de fonctionnalisation selon la revendication 10 ou 11, ledit réactif étant un réactif de capture ou de séparation pour lequel le moyen de capture ou de séparation est constitué par un support solide, tel que particules de polymère ou de silice, magnétiques ou non, ou un filtre ou bien par la paroi interne d'un récipient.

13. Réactif de fonctionnalisation, selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le bras de liaison X est un bras espaceur organique permettant de relier la molécule de liaison et le groupement d'intérêt, tel qu'une simple liaison covalente entre la molécule de liaison et le groupement d'intérêt ou un simple atome de carbone, éventuellement substitué, un enchaînement d'au moins deux atomes de carbone, contenant éventuellement des structures aromatiques et/ou des hétéro-atomes (oxygène, soufre, azote, etc.).

14. Réactif de fonctionnalisation, selon la revendication 13, dans lequel le bras de liaison X comporte une fonction ou une liaison capable d'être clivée par un moyen physico-chimique, photo-chimique, thermique, enzymatique et/ou chimique permettant la séparation de la molécule de liaison par rapport à l'ARN dans des conditions de lumière, de température, enzymatiques ou chimiques particulières.

15. Réactif de fonctionnalisation selon l'une des revendications 10 à 14, dans lequel le groupement d'intérêt est un marqueur ou un précurseur de marquage.

16. Réactif de fonctionnalisation selon la revendication 15, dans lequel le groupement d'intérêt est un marqueur, ledit marqueur ayant un signal de fluorescence intrinsèque mais différent du signal émis par la molécule de liaison, ou n'ayant pas de signal de fluorescence intrinsèque.

17. Utilisation d'un réactif selon l'une des revendications 10 à 16 pour fonctionnaliser au moins une molécule d'acide ribonucléique (ARN).

18. Molécule biologique d'ARN fonctionnalisée susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

19. Kit de détection d'une molécule d'ARN cible, ledit kit comprenant un réactif selon l'une des revendications 10 à 16.

20. Utilisation d'un kit selon la revendication 19 pour détecter au moins une molécule d'ARN cible.

21. Procédé de fonctionnalisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, qui comprend, entre les étapes a) et b), une étape supplémentaire consistant à hydrolyser le groupement monophosphate terminal en position 3' de chaque brin d'ARN à fonctionaliser.

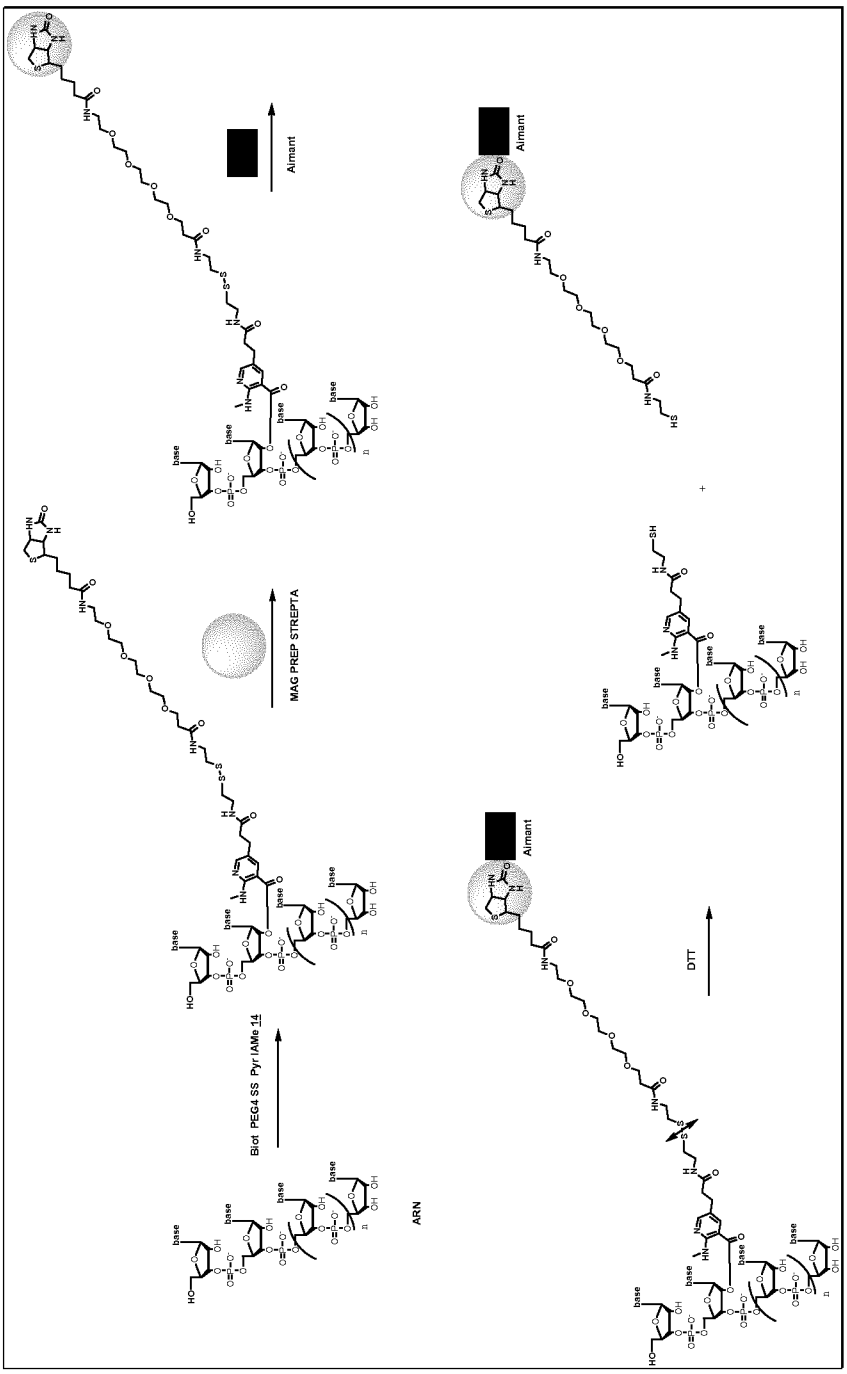

ARN
Biot PEG4 SS Pyr IAMe 14
MAG PREP STREPTA
Almant
DTT
Almant
Almant

Figure 1

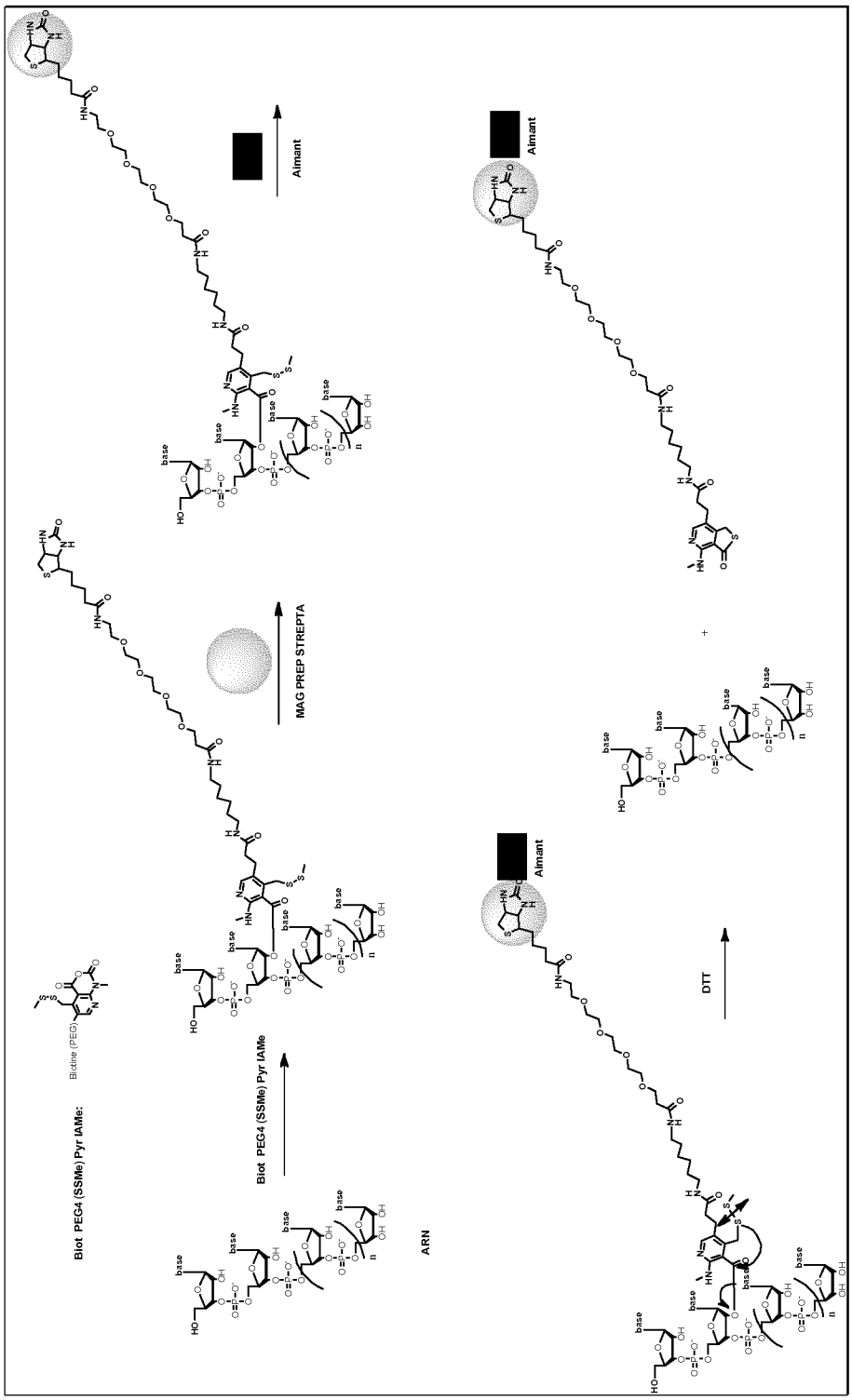

Biot PEG4 (SSMe) Pyr IAMe:
Biotine (PEG)
Biot PEG4 (SSMe) Pyr IAMe
ARN
MAG PREP STREPTA
Aimant
Aimant
Aimant
DTT

Figure 2

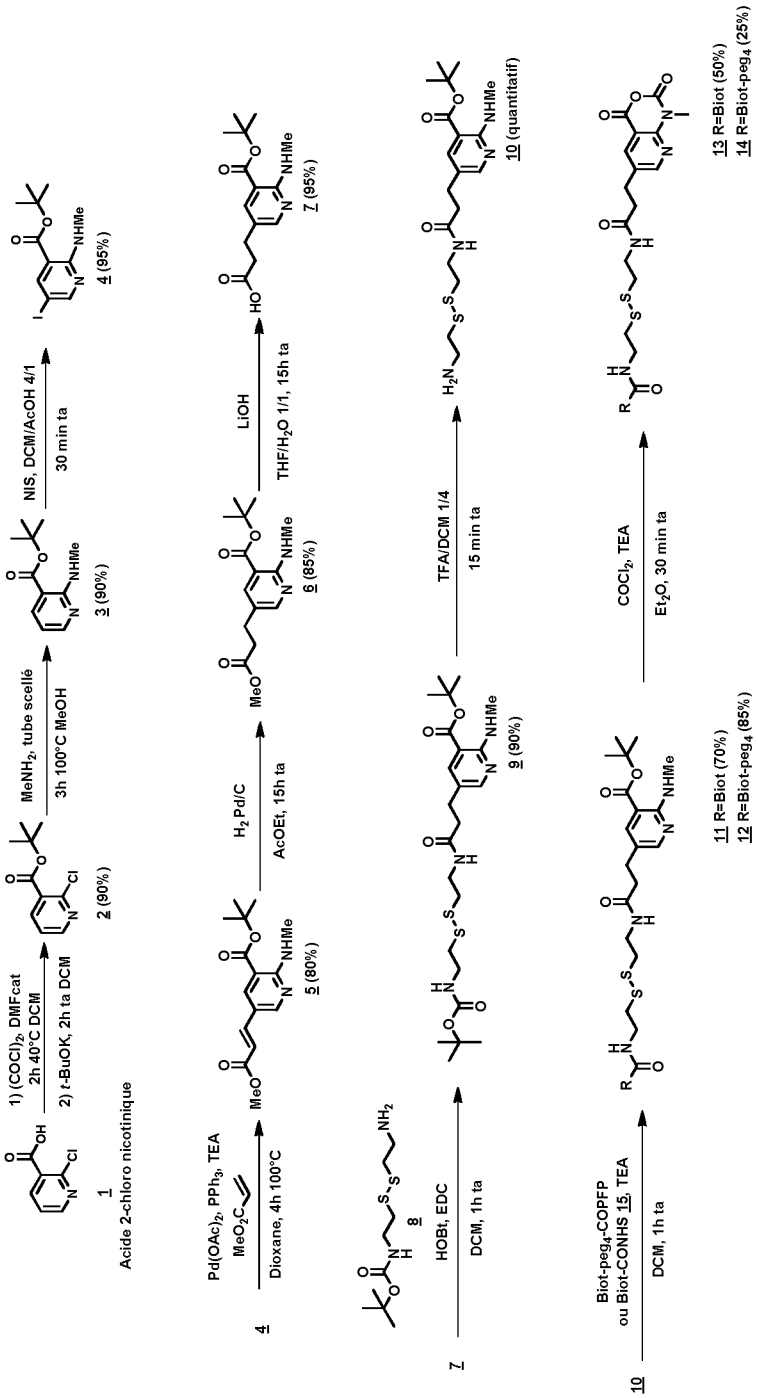

1) (COCl)2, DMFcat
2h 40°C DCM
2) t-BuOK, 2h ta DCM
MeNH2, tube scellé
3h 100°C MeOH
NIS, DCM/AcOH 4/1
30 min ta
1
Acide 2-chloro nicotinique
2 (90%)
3 (90%)
4 (95%)
Pd(OAc)2, PPh3, TEA
MeO2C
Dioxane, 4h 100°C
H2 Pd/C
AcOEt, 15h ta
LiOH
THF/H2O 1/1, 15h ta
5 (80%)
6 (85%)
7 (95%)
HOBt, EDC
DCM, 1h ta
TFA/DCM 1/4
15 min ta
8
9 (90%)
10 (quantitatif)
Biot-peg4-COPFP
ou Biot-CONHS 15, TEA
DCM, 1h ta
COCl2, TEA
Et2O, 30 min ta
11 R=Biot (70%)
12 R=Biot-peg4 (85%)
13 R=Biot (50%)
14 R=Biot-peg4 (25%)

Figure 3

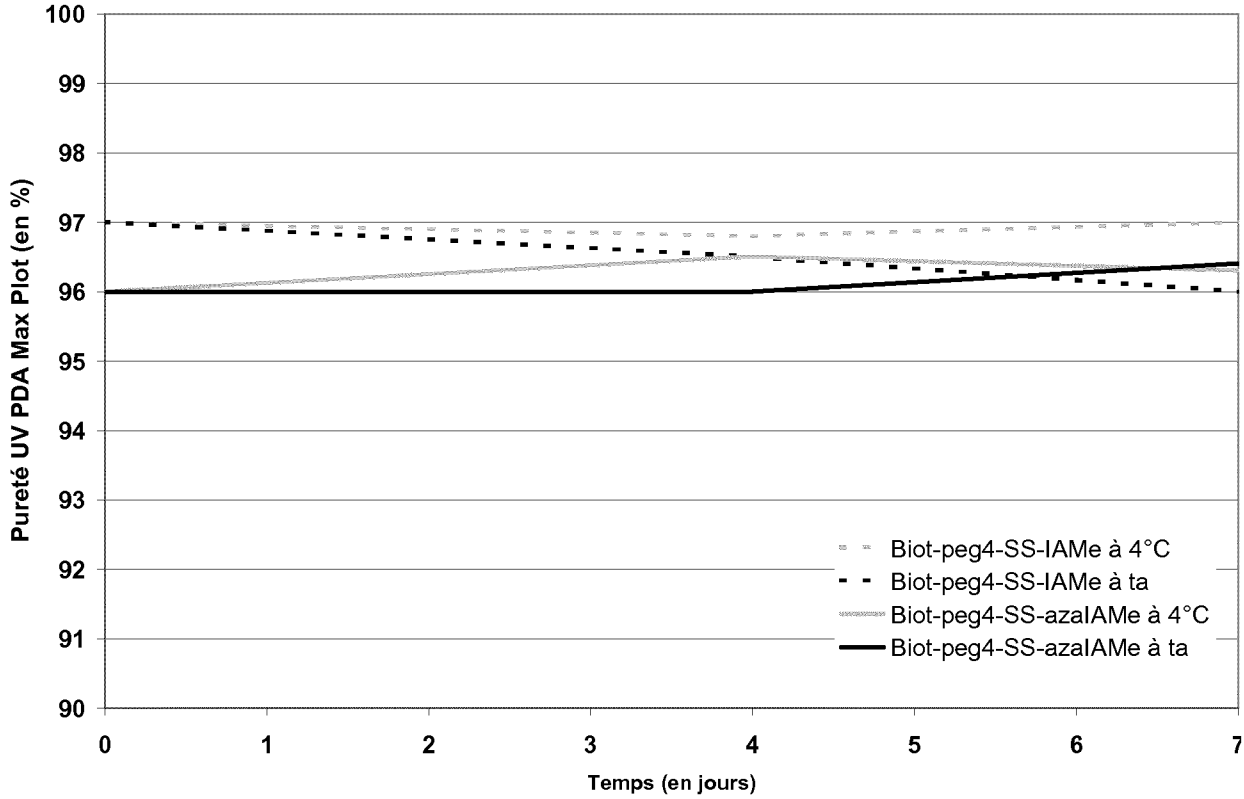


Figure 4

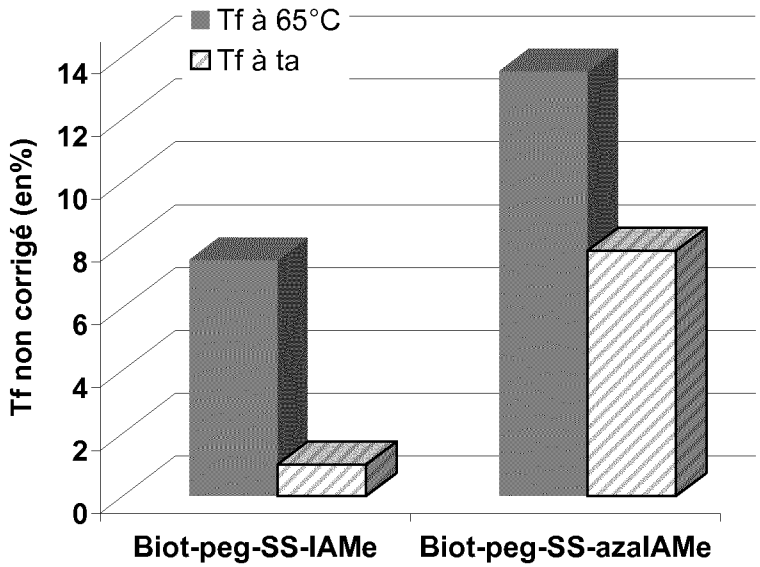


Figure 5

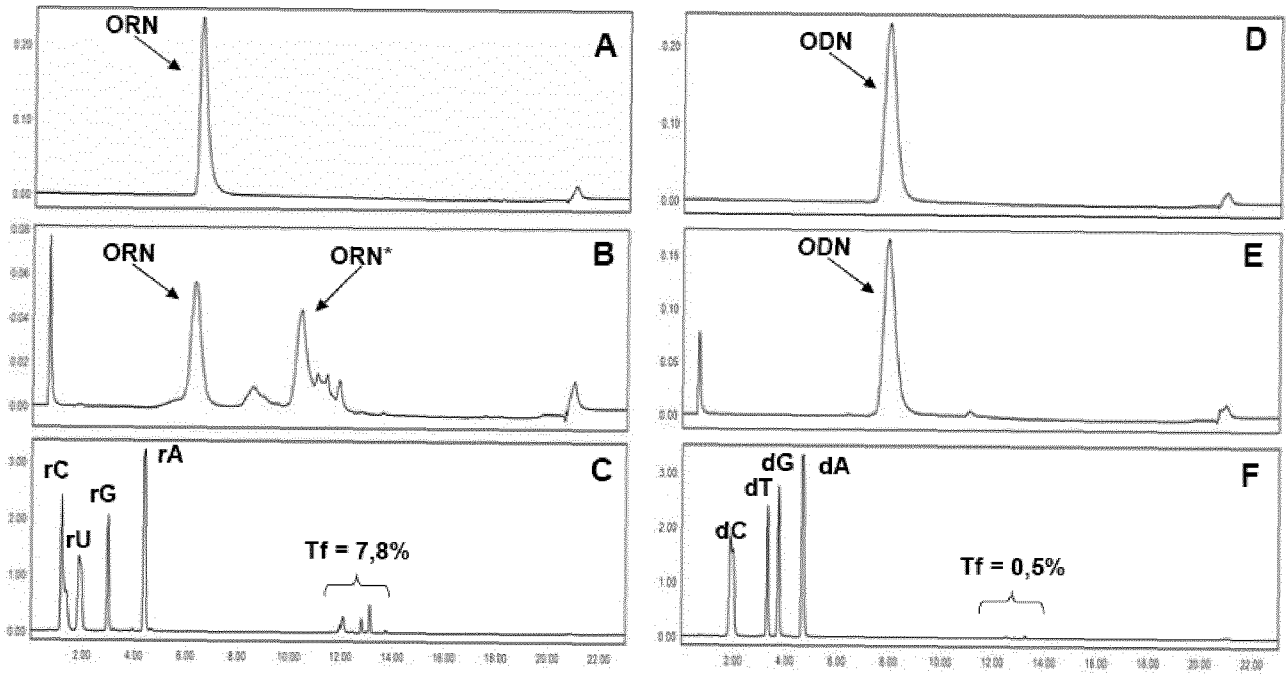


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/065854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D213/80 C07D495/04 C07D519/00 C07H21/00 C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/076794 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; BURR ARNAUD [FR]; LAAYOUN ALI [FR]; LAURENT ALAIN) 14 June 2012 (2012-06-14)	1-21
Y	fonctionalisation d'une molecule ARN qui comprend l'étape de formation d'une liaison entre un groupement hydroxyle de l'ARN avec un dérivé de l'acide aza-isatoic; claims 1-15	1-9, 17-21

X	WO 2004/064759 A2 (CHIRON CORP [US]; VALIANTE NICHOLAS [US]) 5 August 2004 (2004-08-05)	10-16
Y	anhydre de l'acide N-Allyl-5-aza-isatoic :; page 46, paragraph 175	1-9, 17-21

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
27 September 2013	08/10/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lange, Tim

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COPPOLA G M ET AL: "THE CHEMISTRY OF 3-AZAISOTOIC ANHYDRIDES. SYNTHESIS AND REACTIONS OF POLYAZA HETEROCYCLES", JOURNAL OF HETEROCYCLIC CHEMISTRY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 22, no. 1, 1985, pages 193-206, XP000918416, ISSN: 0022-152X, DOI: 10.1002/JHET.5570220147	10-16
Y	page 194; table 1; compounds 3d, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 3l, 8b	1-9, 17-21

X	WO 02/30911 A1 (SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]; ELLIOTT RICHARD LEONARD [GB]; HICKEY DEIR) 18 April 2002 (2002-04-18) Intermediate B52 :; page 22	1-21

X	WO 2008/130600 A2 (AMGEN INC [US]; ALLEN JENNIFER R [US]; BURLI ROLAND [US]; BRYAN MARIAN) 30 October 2008 (2008-10-30)	10-16
Y	anhydre de l'acide 6-Iodo-8-aza-isatoique; page 46, paragraph 166	1-9, 17-21

X	US 2004/167123 A1 (PRATT JOHN K [US] ET AL) 26 August 2004 (2004-08-26)	10-16
Y	1-(3-pyridinylmethyl)-2H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-2,4-dione :; page 79; example 33a	1-9, 17-21

X	WO 2011/047432 A1 (FIBROTECH THERAPEUTICS PTY LTD [AU]; WILLIAMS SPENCER JOHN [AU]; ZAMMI) 28 April 2011 (2011-04-28)	10-16
Y	acide aza-isatoic N- fonctionalisé avec groupement portant une alcyne : 1-[3-methoxy-4-(2-propyn-1-yloxy)phenyl-1-oxo-2-propen-1-yl-2H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-2,4-dione :; page 27	1-9, 17-21

Y	WO 2007/145940 A2 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; WEEKS KEVIN M [US]; WILKINSON KEVIN [US]; VA) 21 December 2007 (2007-12-21) the whole document	1-9, 17-21

	-/--	

3

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STEFANIE A MORTIMER AND KEVIN M WEEKS: "A Fast-Acting Reagent for Accurate Analysis of RNA Secondary and Tertiary Structure by SHAPE Chemistry", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, ACS PUBLICATIONS, US, vol. 129, no. 14, 11 April 2007 (2007-04-11), pages 4144-4145, XP002631927, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA0704028 [retrieved on 2007-03-17] the whole document -----	1-9, 17-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2013/065854

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 annex

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.

The international searching authority has determined that the international application contains multiple (groups) of inventions, namely:

1. Claims 2 (in full); 1, 5-8, 21 (in part)

A method of labeling a ribonucleic acid (RNA) molecule, comprising the step of reacting a free hydroxyl grouping of the ribose with an azaisatoic acid derivative.

2. Claims 1, 3-8, 21 (all in part)

A method of capturing a ribonucleic acid (RNA) molecule, comprising the step of reacting a free hydroxyl grouping of the ribose with an azaisatoic acid derivative.

3. Claims 9 (in full); 1, 3-8, 21 (in part)

A method of separating a ribonucleic acid (RNA) molecule, comprising the step of reacting a free hydroxyl grouping of the ribose with an azaisatoic acid derivative.

4. Claims 10-17, 19, 20

An azaisatoic acid-based functionalization reagent of formula (1) or (2), the use thereof, a detection kit comprising such a reagent and the use of said kit.

5. Claim 18

A biological RNA molecule functionalized by a method comprising the step of reacting a free hydroxyl grouping of the RNA ribose with a molecule containing azaisatoic acid.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/065854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012076794 A1	14-06-2012	EP 2649055 A1	16-10-2013
		FR 2968302 A1	08-06-2012
		US 2013253179 A1	26-09-2013
		WO 2012076794 A1	14-06-2012
WO 2004064759 A2	05-08-2004	CA 2513655 A1	05-08-2004
		EP 1594524 A2	16-11-2005
		ES 2391770 T3	29-11-2012
		US 2004241192 A1	02-12-2004
		US 2012244182 A1	27-09-2012
		WO 2004064759 A2	05-08-2004
WO 0230911 A1	18-04-2002	AR 035068 A1	14-04-2004
		AT 415392 T	15-12-2008
		AU 2359902 A	22-04-2002
		CA 2459746 A1	18-04-2002
		EP 1337517 A1	27-08-2003
		ES 2317949 T3	01-05-2009
		JP 2004511473 A	15-04-2004
		US 2004058941 A1	25-03-2004
		US 2006241126 A1	26-10-2006
		WO 0230911 A1	18-04-2002
WO 2008130600 A2	30-10-2008	AU 2008241483 A1	30-10-2008
		CA 2683956 A1	30-10-2008
		EP 2142509 A2	13-01-2010
		JP 2010524942 A	22-07-2010
		US 2009156605 A1	18-06-2009
		US 2011224248 A1	15-09-2011
		WO 2008130600 A2	30-10-2008
US 2004167123 A1	26-08-2004	NONE	
WO 2011047432 A1	28-04-2011	CN 102574843 A	11-07-2012
		EP 2491030 A1	29-08-2012
		JP 2013508306 A	07-03-2013
		US 2012270863 A1	25-10-2012
		WO 2011047432 A1	28-04-2011
WO 2007145940 A2	21-12-2007	US 2010035761 A1	11-02-2010
		WO 2007145940 A2	21-12-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2013/065854

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07D213/80 C07D495/04 C07D519/00 C07H21/00 C12Q1/68
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07D C07H C12Q

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2012/076794 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; BURR ARNAUD [FR]; LAAYOUN ALI [FR]; LAURENT ALAIN) 14 juin 2012 (2012-06-14)	1-21
Y	fonctionalisation d'une molecule ARN qui comprend l'étape de formation d'une liaison entre un groupement hydroxyle de l'ARN avec un dérivé de l'acide aza-isatoic; revendications 1-15 -----	1-9, 17-21
X	WO 2004/064759 A2 (CHIRON CORP [US]; VALIANTE NICHOLAS [US]) 5 août 2004 (2004-08-05)	10-16
Y	anhydre de l'acide N-Allyl-5-aza-isatoic :; page 46, alinéa 175 ----- -/--	1-9, 17-21

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

[X] 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'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
27 septembre 2013	08/10/2013

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

3

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	COPPOLA G M ET AL: "THE CHEMISTRY OF 3-AZAISOTOIC ANHYDRIDES. SYNTHESIS AND REACTIONS OF POLYAZA HETEROCYCLES", JOURNAL OF HETEROCYCLIC CHEMISTRY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 22, no. 1, 1985, pages 193-206, XP000918416, ISSN: 0022-152X, DOI: 10.1002/JHET.5570220147	10-16
Y	page 194; tableau 1; composés 3d, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 3l, 8b	1-9, 17-21

X	WO 02/30911 A1 (SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]; ELLIOTT RICHARD LEONARD [GB]; HICKEY DEIR) 18 avril 2002 (2002-04-18) Intermediate B52 :; page 22	1-21

X	WO 2008/130600 A2 (AMGEN INC [US]; ALLEN JENNIFER R [US]; BURLI ROLAND [US]; BRYAN MARIAN) 30 octobre 2008 (2008-10-30)	10-16
Y	anhydre de l'acide 6-Iodo-8-aza-isatoique; page 46, alinéa 166	1-9, 17-21

X	US 2004/167123 A1 (PRATT JOHN K [US] ET AL) 26 août 2004 (2004-08-26)	10-16
Y	1-(3-pyridinylmethyl)-2H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-2,4-dione :; page 79; exemple 33a	1-9, 17-21

X	WO 2011/047432 A1 (FIBROTECH THERAPEUTICS PTY LTD [AU]; WILLIAMS SPENCER JOHN [AU]; ZAMMI) 28 avril 2011 (2011-04-28)	10-16
Y	acide aza-isatoic N- fonctionalisé avec groupement portant une alcyne : 1-[3-methoxy-4-(2-propyn-1-yloxy)phenyl-1-oxo-2-propen-1-yl-2H-pyrido[2,3-d][1,3]oxazine-2,4-dione :; page 27	1-9, 17-21

Y	WO 2007/145940 A2 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; WEEKS KEVIN M [US]; WILKINSON KEVIN [US]; VA) 21 décembre 2007 (2007-12-21) le document en entier	1-9, 17-21

	-/--	

3

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	STEFANIE A MORTIMER AND KEVIN M WEEKS: "A Fast-Acting Reagent for Accurate Analysis of RNA Secondary and Tertiary Structure by SHAPE Chemistry", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, ACS PUBLICATIONS, US, vol. 129, no. 14, 11 avril 2007 (2007-04-11), pages 4144-4145, XP002631927, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA0704028 [extrait le 2007-03-17] le document en entier -----	1-9, 17-21

3

Demande internationale n°
PCT/EP2013/065854

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

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 effectueé, en particulier :

3. ☐ Les revendications n°s
parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pasrédigées 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: 2(complètement); 1, 5-8, 21(en partie)

   Procédé de marquage d'une molécule d'acide ribonucléique (ARN) qui comprend l'étape de faire réagir un groupement hydroxyle libre de la ribose avec un dérivé de l'acide aza-isatoique.

   ---

2. revendications: 1, 3-8, 21(toutes en partie)

   Procédé de capture d'une molécule d'acide ribonucléique (ARN) qui comprend l'étape de faire réagir un groupement hydroxyle libre de la ribose avec un dérivé de l'acide aza-isatoique.

   ---

3. revendications: 9(complètement); 1, 3-8, 21(en partie)

   Procédé de séparation d'une molécule d'acide ribonucléique (ARN) qui comprend l'étape de faire réagir un groupement hydroxyle libre de la ribose avec un un dérivé de l'acide aza-isatoique.

   ---

4. revendications: 10-17, 19, 20

   Réactif de fonctionnalisation des formules (1) ou (2) à base de l'acide aza-isatoique, son utilisation, kit de détection comprenant un tel réactif et utilisation du kit.

   ---

5. revendication: 18

   Molécule biologique d'ARN fonctionnalisée par un procédé qui comprend l'étape de faire réagir un groupement hydroxyle libre de la ribose d'ARN avec un molécule comprenant l'acide aza-isatoique.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2013/065854

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012076794 A1	14-06-2012	EP 2649055 A1	16-10-2013
		FR 2968302 A1	08-06-2012
		US 2013253179 A1	26-09-2013
		WO 2012076794 A1	14-06-2012
WO 2004064759 A2	05-08-2004	CA 2513655 A1	05-08-2004
		EP 1594524 A2	16-11-2005
		ES 2391770 T3	29-11-2012
		US 2004241192 A1	02-12-2004
		US 2012244182 A1	27-09-2012
		WO 2004064759 A2	05-08-2004
WO 0230911 A1	18-04-2002	AR 035068 A1	14-04-2004
		AT 415392 T	15-12-2008
		AU 2359902 A	22-04-2002
		CA 2459746 A1	18-04-2002
		EP 1337517 A1	27-08-2003
		ES 2317949 T3	01-05-2009
		JP 2004511473 A	15-04-2004
		US 2004058941 A1	25-03-2004
		US 2006241126 A1	26-10-2006
		WO 0230911 A1	18-04-2002
WO 2008130600 A2	30-10-2008	AU 2008241483 A1	30-10-2008
		CA 2683956 A1	30-10-2008
		EP 2142509 A2	13-01-2010
		JP 2010524942 A	22-07-2010
		US 2009156605 A1	18-06-2009
		US 2011224248 A1	15-09-2011
		WO 2008130600 A2	30-10-2008
US 2004167123 A1	26-08-2004	AUCUN	
WO 2011047432 A1	28-04-2011	CN 102574843 A	11-07-2012
		EP 2491030 A1	29-08-2012
		JP 2013508306 A	07-03-2013
		US 2012270863 A1	25-10-2012
		WO 2011047432 A1	28-04-2011
WO 2007145940 A2	21-12-2007	US 2010035761 A1	11-02-2010
		WO 2007145940 A2	21-12-2007