

PROCÉDÉ DE SYNTHÈSE EN SOLUTION DE MACROMOLÉCULES À PARTIR
D'UNITÉS DE DÉRIVÉS DE GLUCIDES

Domaine technique de l'invention

- 5 La présente invention appartient au domaine de la synthèse de macromolécules organiques. Plus spécifiquement, la présente invention concerne un procédé de production de macromolécules d'intérêt à partir d'unités de monosaccharides ou oligosaccharides ou de dérivés de telles unités. Ce procédé se déroule en phase liquide (solution) et utilise des molécules d'ancrage solubles en milieu organique et plus
10 particulièrement dans des solvants apolaires. Ces molécules d'ancrage (ou support liquide) confèrent aux macromolécules (ou intermédiaires) d'intérêt, lorsqu'elles en sont liées : une protection transitoire d'au moins une fonction chimique et une excellente solubilité dans des solvants organiques apolaires et en conséquence, des purifications par simple extraction ou par filtration sur silice. Les macromolécules visées peuvent
15 notamment être des macromolécules d'intérêt biologique, tels que les oligonucléotides et les oligosaccharides, et elles peuvent contenir des unités qui ne sont pas des mono- ou oligosaccharides.

État de la technique

- 20 La présente invention concerne un nouveau procédé permettant la synthèse de macromolécules comportant des unités de monosaccharides et/ou d'oligosaccharides et/ou de leurs dérivés ; ces unités peuvent être ou peuvent comporter notamment des pentoses ou des hexoses. Ainsi et plus particulièrement, la présente invention concerne la synthèse d'oligonucléotides (ou de leurs dérivés) et la synthèse
25 d'oligosaccharides (ou de leurs dérivés).

- Habituellement, les oligonucléotides sont préparés, à l'échelle du laboratoire, par la synthèse sur support solide, avec des automates. De nombreux efforts ont permis d'améliorer ces équipements au stade industriel pour des productions plus conséquentes
30 (> 1 kilogramme). Cependant, depuis la fin du siècle dernier, les oligonucléotides thérapeutiques ont connu un grand essor déclenchant un réel intérêt pour ces espèces moléculaires. A ce jour, plus d'une centaine d'oligonucléotides sont en cours d'essais cliniques et huit médicaments ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) (voir Y. S. Sanghvi, « A Status Update for Modified Oligonucleotides for
35 Chemotherapeutics Applications », *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2011, 46:4.1.1-4.1.22.).

Le premier oligonucléotide approuvé fut le fomivirsen ou Vitravene™ (voir M. D. de Smet et al., « *Fomovirsen – a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis* », *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 1999, 7, 189-198 et S. T. Cooke et al., « *RNA-Targeted Therapeutics* », *Cell Metabolism*, 2018, 27, 714-739), un oligodésoxynucléotide
5 constitué de 21 motifs liés par des liaisons phosphorothioates. Il est utilisé dans le traitement de la rétinite à cytomégalovirus.

Plus tard, le Macugen™ (pegaptanib sodium) et le Kynamro™ (mipomersen sodium) ont été approuvés successivement en 2004 et 2013, respectivement indiqués dans le traitement de la forme néovasculaire (humide) de la dégénérescence maculaire liée à
10 l'âge (DMLA) et dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote (voir Sanghvi et Schulte, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2004, 6, 765).

Jusqu'à présent, la synthèse d'oligonucléotides en phase solide a permis de produire, en routine, des oligonucléotides à l'échelle du kilogramme, avec de bonnes qualités (voir
15 Sanghvi, Y. S. (2019) « *Large-scale automated synthesis of therapeutic oligonucleotides : A status update* », paru dans S. Agrwal & M. J. Gait (Eds.) *Advances in nucleic acid therapeutic* (pp. 453-473)). Bien que de nombreux efforts d'optimisations aient été accomplis, les procédés de productions d'oligonucléotides sont encore perfectibles. La synthèse d'oligonucléotides en phase liquide se positionne, de plus en plus, comme une
20 réponse efficace à la production d'oligonucléotides.

Quelle que soit la phase (solide (hétérogène) ou liquide (solution)) où a lieu la réaction, la synthèse d'oligonucléotides se résume en la formation de liaisons esters phosphoriques entre des nucléosides, selon un ordre défini (voir H. Lönneberg, « *Synthesis of
25 oligonucleotides on a soluble support* », *Beilstein J. Org. Chem.*, 2017, 13, 1368-1387 et A. Molina & Y. S. Sanghvi, « *Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis : Past, Present, and Future Predictions* », *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2019, 77 (1)). Souvent, la synthèse d'oligonucléotides en phase liquide (acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléique (ARN)) débute par la fixation de la molécule d'ancrage sur l'extrémité
30 3' d'un nucléoside ; l'élongation s'effectuant de 3' vers 5'. A ce stade, le premier cycle de synthèse commence avec l'entrée en jeu d'un dérivé nucléosidique phosphorylé en position 3' (phosphoramidite ou H-phosphinate ou phosphotriester), qui va réagir avec l'alcool en position 5' du nucléoside ancré sur un support de synthèse.

35 A l'exception de l'alcool entrant en réaction, toutes les autres fonctions nucléophiles doivent être préalablement protégées. Ainsi, les amines des bases nucléiques sont

préférentiellement protégées par acylation (benzoyle pour la cytosine et l'adénine, isobutyle pour la guanine) alors que les fonctions alcools du désoxyribose et du ribose sont respectivement masquées par des éthers de trityle (diméthoxytrityle ou monométhoxytrityle) en position 5' et/ou par des éthers de silyle (*tert*-butyldiméthylsilyle ou triisopropylsilyloxyméthyle) en position 2'.

Selon la nature du nucléoside phosphorylé choisi, les conditions opératoires de la réaction de couplage sont différentes. Dans le cas des nucléosides phosphoramidites (voir S. L. Beaucage & M. H. Caruthers, « *Deoxynucleoside Phosphoramidites – A new Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis* », Tetrahedron Letters, 1981, 22, 1859-1862) et des nucléosides H-phosphonates, les réactions de couplage sont suivies par une réaction d'oxydation pour conduire aux phosphotriesters correspondants. Dans le cas des nucléosides phosphates, les phosphotriesters correspondants sont obtenus par estérifications avec le nucléoside précédent (voir C. B. Reese & Z. Pei-Zhuo, « *Phosphotriester Approach to the Synthesis of Oligonucleotides: A Reappraisal* », J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1993, 2291-2301, V. A. Efimov et al., « *Application of new catalytic phosphate protecting groups for the highly efficient phosphotriester oligonucleotide synthesis* », Nucleic Acids Res. 1986, 14, 6525-6540, G. van der Marel et al., « *A New Approach to the Synthesis of Phosphotriester Intermediates of Nucleosides and Nucleic Acids* », Tetrahedron Lett., 1981, 22, 3887-3890 et E. de Vroom et al., « *Use of a 1-hydroxybenzotriazole activated phosphorylating reagent towards the synthesis of short RNA fragments in solution* », Nucleic Acids Res., 1986, 14, 5885-5900).

Diverses molécules d'ancrage ont été décrites dans la littérature en relation avec la synthèse d'oligonucléotides en phase liquide. Historiquement, les fondations de la synthèse d'oligonucléotides ont été posées par les travaux de Hayatsu et Khorana (voir « *Deoxyribonucleoside Synthesis on a Polymer Support* », J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 13, 3182-3183). Cette approche inspirée de la méthodologie de synthèse peptidique décrite par Merrifield, utilisait un polystyrène soluble comme molécule d'ancrage (5'-O-monométhoxytrityle (MMTr) greffé). Cependant, ce polystyrène devient insoluble dans les solvants organiques au-delà de trois nucléotides, et en conséquence, l'isolation du produit devient faible.

D'autres polymères ont été étudiés, tels que la cellulose (Biochemistry 1968, 7, 8, 2809-2813) ou l'alcool polyvinylique (H. Schott et al., « *Liquid-Phase-Synthese von Oligothymidylphosphaten* », Die Makromolekulare Chemie, 1973, 173, 247-251). Dans

ces deux cas, lors de l'incorporation du premier nucléoside sur le support, une réaction dite de coiffage, des groupes hydroxyles libres (non fonctionnalisés), est nécessaire afin d'éviter la présence d'oligonucléotides tronqués en fin de synthèse.

- 5 Dans les années 90, une autre catégorie de polymère a été largement étudiée en tant que molécule d'ancrage : le polyéthylène glycol (ou PEG). Avec ce type de supports solubles, le groupe de Bonora a réussi la synthèse d'oligonucléotides à l'échelle du gramme tout en réduisant considérablement le temps de manipulation (voir « *HELP (High Efficiency Liquid Phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support* », *Nucleic Acids Research*, 1990, 18, 3155-3159 et « *Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach* », *Nucleic Acids Research*, 1993, 21, 1213-1217).

- Plus récemment, le groupe de Livingston a développé et utilisé des membranes de séparations moléculaires par nanofiltration (voir P. R. J. Gaffney et al., « *Liquid-Phase Synthesis of 2'-Methyl-RNA on a Homostar Support through Organic-Solvent Nanofiltration* », *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 9535-9543 et J. F. Kim et al., « *Organic Solvent Nanofiltration (OSN) : A New Technology Platform for Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis (LPOS)* », *Org. Proc. Res. Dev.*, 2016, 20, 1439-1452). Elles permettent de
20 faciliter et d'accélérer les étapes de purification des oligonucléotides en croissance.

- D'une façon générale, l'utilisation de polyéthylène glycols (PEG) comme matrice d'ancrage à plusieurs avantages tels que : l'utilisation de l'acétonitrile comme solvant ; l'obtention d'oligonucléotides de bonne pureté ; des purifications simplifiées (à chaque
25 étape) ; la possibilité d'atteindre des quantités raisonnables d'oligonucléotides ; la polyvalence au niveau des réactions de couplages (phosphoramidites, H-phosphonate (voir K. J. Padiya et al., « *Large Scale, Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis by Alkyl H-phosphonate Approach* », *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, 8, 337-342) et phosphates) et la diminution de la quantité de monomères mise en jeu.

- 30 Les principaux verrous à l'utilisation des PEG à l'échelle industrielle sont : le grand nombre d'étapes de précipitations ; une consommation excessive de solvants et le coût des membranes de nanofiltration.

- En 2017, l'utilisation d'un dérivé d'adamantane a été décrite comme molécule d'ancrage
35 pour la synthèse d'oligonucléotides en phase liquide (A. Schwenger et al., « *Solution-Phase Synthesis of Branched Oligonucleotides with up to 32 Nucleotides and the*

Reversible Formation of Materials », Eur. J. Org. Chem., 2017, 5852-5864). Un avantage de ce support réside dans la purification par simple extraction. Le principal inconvénient de cette molécule d'ancrage est son faible facteur E (qui exprime le rapport massique déchet/produit désiré) car un grand volume de solvant est nécessaire pour les différentes

5 étapes de purification par extraction. Le même groupe de recherche a décrit un dérivé d'adamantane tétrasubstitué comme molécule d'ancrage pour la synthèse d'oligonucléotides en phase liquide. Là aussi, le grand volume de solvant nécessaire pour les purifications et l'excès de monomères de phosphoramidites freinent son développement au niveau industriel.

10

En 2006, la première molécule d'ancrage ionique, en l'occurrence de type imidazolium, a été décrite (R. A. Donga et al., « *A Novel Approach to Oligonucleotide Synthesis Using an Imidazolium Ion Tag as a Soluble Support* », J. Org. Chem., 2006, 71, 7907-7910). La purification de l'oligonucléotide en cours d'élongation s'opère par précipitation et

15 extraction. Dans une vision industrielle, ce support liquide est lesté par le grand volume de solvant nécessaire pour les purifications de l'oligonucléotide en croissance.

Des molécules d'ancrage de type β -cyclodextrines solubles, à base de D-glucopyranose, ont démontré leur efficacité pour la synthèse d'oligonucléotides en phase liquide (A.

20 Gimenez Molina et al., « *Acetylated and Methylated β -Cyclodextrins as Viable Soluble Supports for the Synthesis of Short 2'-Oligodeoxyribo-nucleotides in Solution* », Molecules, 2012, 17, 12102-12120). Les avantages associés à ces supports solubles sont leur coût et une diminution de la quantité de monomères nécessaire pour les étapes de couplage.

25 Les points faibles de ces matrices résident au niveau de la purification. En effet, pour chaque cycle, une purification par colonne de chromatographie est obligatoire.

Une autre catégorie de molécules d'ancrage, constituée de dérivés du pentaérythritol fonctionnalisé, a été décrite. Ils ont été utilisés pour la synthèse de l'ADN (V. Kungurtsev

30 et al., « *Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2'-deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support* », (Eur. J. Org. Chem., 2013, 6687-6693) et de l'ARN (A. Gimenez Molina et al., « *Solution phase synthesis of short oligoribonucleotides on a precipitative tetrapodal support* », Beilstein J. Org. Chem., 2014, 10, 2279-2285 et Current Organic Synthesis, 2014, 12, 202-207). Les avantages de ce

35 support liquide sont : la possibilité d'effectuer les réactions d'élongation selon la chimie

des phosphoramidites ou des phosphotriesters ; la stabilité de la matrice ; la présence de quatre sites d'ancrage ; des purifications par précipitation.

Les principaux obstacles à l'industrialisation de ce support liquide sont l'utilisation de deux groupes protecteurs hydrophobes (en 2' et 5'), lors de la synthèse de l'ARN, et l'utilisation
5 de monomères non commerciaux et les nombreuses purifications par précipitation.

Les dérivés de l'acide gallique, comme support soluble, ont également été utilisés pour la production d'oligonucléotides en solution (voir JP 2010-275254 et WO 2013/179412 ainsi que les publications de S. Kim et al., « *Liquid-Phase RNA Synthesis by Using Alkyl-Chain-Soluble Support* », Chem. Eur. J., 2013, 19, 8615-8620, et de T. Shoji et al., « *Synthesis of Conjugated Oligonucleotide in Solution Phase Using Alkyl-chain-soluble Support* », Chem. - Lett., 2014, 43, 1251-1253). En utilisant ces derniers, en combinaison avec la
10 chimie des phosphoramidites, la synthèse d'un ARN (21-mères) a été réalisée avec un excellent rendement (26%) et une bonne pureté (78%). Cependant, les nombreuses
15 étapes de purification (> 50) rendent ces molécules d'ancrage inadaptées à une utilisation industrielle.

Dans la même veine, les molécules d'ancrage nommées Ajiphase™ ont été décrites pour la production d'oligonucléotides (voir S. Katayama & K. Hirai, « *Liquid-phase synthesis of oligonucleotides* », paru dans S. Obika & M. Sekine (Eds.), "Synthesis of therapeutic oligonucleotides" (pp. 83-95), Springer Singapore, 2018). L'utilisation d'Ajiphase™ comme
20 molécule d'ancrage pour la production d'oligonucléotides présente certains avantages : on peut purifier les oligomères ancrés par simple précipitation dans l'acétonitrile ou le méthanol ; le nombre d'équivalents de phosphoramidite est faible (< 2 équivalents) ; le
25 rendement global est amélioré et la consommation de solvants est réduite. Cependant, la principale limitation de ce procédé reste la purification (une précipitation par cycle).

La présente invention concerne également les oligosaccharides, appelés autrefois les « hydrates de carbone ». Ils sont impliqués dans plusieurs processus biologiques et
30 jouent un rôle primordial dans le monde vivant. En effet, les sucres sont impliqués dans la structure de molécules essentielles telles que les acides nucléiques (ribose et désoxyribose). Les oligosaccharides et les polysaccharides sont constitués de monosaccharides liés entre eux par une liaison glycosidique. Dans l'optique de la connaissance des rôles des sucres dans le monde vivant, les chimistes ont réalisé des
35 avancées conceptuelles et pratiques permettant d'accéder à des oligosaccharides de plus en plus complexes (M. Panza et al., « *Automated Chemical Oligosaccharide Synthesis* :

Novel Approach to Traditional Challenges », Chem. Rev. 2018, 118, 17, 8105-8150 et M. Guberman & P. H. Seeberger, « *Automated Glycan Assembly : A Perspective* », J. Am. Chem. Soc. 2019, 141, 14, 5581-5592).

- 5 Depuis les travaux de Merrifield, dans les années 1960, sur la synthèse peptidique sur support solide, de nombreux chimistes ont développé des méthodes similaires, adaptées à la synthèse d'oligosaccharides, afin de pouvoir bénéficier des avantages de cette méthodologie, en l'occurrence : l'usage de réactifs en excès et les purifications par simple lavage du support solide. Toutefois, cette approche de synthèse d'oligosaccharides
- 10 comporte quelques problèmes tels que : le choix du support solide, le design de l'espaceur, la sélection des groupes protecteurs, le suivi des réactions, le choix des monomères donneurs ou accepteurs et le décrochage final de l'oligosaccharide cible de la matrice (voir P. H. Seeberger & S. J. Danishefsky, « *Solid-Phase Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates by the Glycal Assembly Method : A Five Year Retrospective* », Acc. Chem. Res., 1998, 31, 685-695 ; P. H. Seeberger & W.-C. Haase, « *Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries* », Chem. Rev., 2000, 100, 4349-4393 et P. H. Seeberger, « *Automated oligosaccharide synthesis* », Chem. Soc. Rev. 2008, 37, 19-28).
- 15
- 20 En 1973, la première synthèse d'un trisaccharide sur support solide a été décrite (voir J. M. Frechet & C. Schuerch, « *Solid-Phase Synthesis of Oligosaccharides. I. Preparation of the Solid Support. Poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]* », J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 492-496 ; Frechet, J. M. dans « *Polymer-Supported Reactions in Organic Synthesis* », Hodge, P., Sherrington, D. C., Eds.; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK, 1980, pp
- 25 407-434 et Carbohydr. Res., 1972, 399-412).

Inspirés par ces travaux, Seeberger et al., ont conçu une machine permettant la synthèse automatisée d'oligosaccharides (P.H. Seeberger, « *Solid Phase Oligosaccharide Synthesis* », J. Carbohydr. Chem., 2002, 21, 613-643 et M. Weishaupt et al., « *Solid*

30 *Phase Synthesis of Oligosaccharides* », paru dans « *Methods in Enzymology* », 2010, 478, 463-484). Ainsi, ils ont décrit la synthèse de plusieurs oligosaccharides complexes tels que des dérivés de dodécamères β -glucan.

- L'utilisation de glycal à des fins de couplage glycosidique a été explorée sur support
- 35 solide (J. T. Randolph et al., « *Major Simplifications in Oligosaccharide Synthesis Arising from a Solid-Phase Based Method : An Application to the Synthesis of the Lewis b*

Antigen », J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 5712-5719 ; C. Zheng et al., « *Solid Support Oligosaccharide Synthesis : Construction of β -Linked Oligosaccharides by Coupling of Glycal Derived Thioethyl Glycosyl Donors* », J. Org. Chem., 1998, 63, 1126-1130 et K.A. Savin et al., « *A New Polymer Support Silylene Linking Method for Hindered Hydroxyl-Bearing Systems* », J. Org. Chem., 1999, 64, 4183-4186). Ce concept de couplage glycosidique est basé sur l'activation du glycal avec un électrophile (le dimethyldioxirane par exemple).

Il s'ensuit de ce qui vient d'être exposé que les principaux défis à relever pour la synthèse d'oligosaccharides en phase solide sont : l'usage d'unités de monomères en excès, l'impossibilité de contrôler l'anométrie de chaque monomère introduit, l'extrapolation à toute type de liaisons glycosidiques, la faible cinétique du clivage des espaceurs, la synthèse complexes des espaceurs, la nécessité d'un équipement spécial (susceptible de descendre à environ - 20 °C) et des capacités de productions faibles.

En somme, la production de macromolécules, d'oligonucléotides et d'oligosaccharides, à l'échelle industrielle à moindre coût et avec une faible empreinte environnementale, est illusoire avec les méthodologies actuelles. C'est justement l'objet de la présente invention. En effet, les inventeurs ont développé une gamme de groupes protecteurs (ou molécules d'ancrage ou molécules solubilisantes ou matrices d'ancrage) capable de permettre la synthèse d'oligonucléotides et d'oligosaccharides à faible coût, faible impact environnemental et faible complexité. En d'autres termes, l'utilisation de ces molécules d'ancrage permet de combiner les avantages de la synthèse en phase liquide et de la synthèse en phase solide (l'homogénéité du milieu réactionnel, du fait que les supports sont solubles, ce qui permet des cinétiques linéaires ; la possibilité de réduire la quantité de réactifs coûteux ainsi que les solvants ; la possibilité de mettre en œuvre des réactions à grande échelle (lot ou batch) ; des purifications simplifiées des macromolécules en cours d'élongation, des réactifs en excès et des sous-produits. Ces purifications s'appuient spécifiquement sur les propriétés physicochimiques et la nature de la molécule d'ancrage, elles s'effectuent le plus souvent par la technique d'extraction liquide-liquide qui est basée sur la distribution sélective (ou coefficient de partage ou coefficient de distribution) des solutés dans deux liquides quasiment non-miscibles.

Objet de l'invention

La présente invention propose de résoudre les difficultés laissées dans l'art antérieur, notamment en ce qui concerne la technique de purification par d'une part, la dérivation

des groupes protecteurs qui pourraient être solubles dans des solvants apolaires et d'autre part, par l'utilisation de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes, capable d'entraîner une solubilité sélective lors de la production de macromolécules biologiques (oligonucléotides et oligosaccharides) en phase liquide (ou solution). En effet, les inventeurs ont trouvé que l'utilisation des polyoléfines, et en particulier des dérivés de polyisobutènes (PIB), comme groupes protecteurs ou molécules d'ancrage ou supports liquide ou matrices d'ancrage, permet la synthèse de ces macromolécules en solution (solvants halogénés et/ou non halogénés) tout en facilitant leur purification par extraction liquide-liquide.

La présente invention vise dès lors la synthèse de macromolécules par élongation successive d'unités diverses, qui sont majoritairement des dérivés de glucides pouvant être identiques ou différents. Lesdites macromolécules peuvent notamment être des oligonucléotides ou des oligosaccharides.

Un premier objet de la présente invention est un procédé de synthèse de macromolécules composées d'unités U qui sont majoritairement des monosaccharides ou dérivés de monosaccharides pouvant être identiques ou différents, lesdites macromolécules présentant une première et une deuxième extrémité, ledit procédé de synthèse procédant par élongation successive de ladite deuxième extrémité par un monomère ou oligomère M présentant au moins deux fonctions, et ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- dans une première étape appelée ancrage, la première unité U1 de ladite macromolécule, correspondant à un monomère M1 ou une unité terminale d'un oligomère M1, est fixée par une liaison covalente (éther, ester ou toutes autres fonctions compatibles avec le présent procédé) à une molécule d'ancrage soluble dans des solvants organiques, ladite liaison covalente résultant d'une réaction d'une première des fonctions dudit monomère M1 ou dudit oligomère M1 avec une fonction de ladite molécule d'ancrage, la deuxième terminaison est possiblement une autre fonction dudit monomère M1 ou dudit oligomère M1 ayant été protégée, préalablement à ladite réaction, par, au moins un premier groupe protecteur GP1, et possiblement par un deuxième groupe protecteur GP2 et un *n*ième groupe protecteur GPn ;
- dans une deuxième étape appelée déprotection, l'un desdits groupes protecteur GP1 ou GP2 ou GPn est retiré, laissant sur ledit monomère M1 ou ledit oligomère M1 au moins une fonction chimique libre ;
- dans une troisième étape appelée couplage, on fait réagir un deuxième monomère M2 ou oligomère M2, portant au moins une fonction chimique libre et au moins une fonction

chimique protégée par un groupe protecteur GP3, de manière à ce que sa fonction chimique libre forme, par réaction avec ladite fonction libre dudit premier monomère M1 ou oligomère M1, une liaison covalente, créant ainsi une nouvelle molécule formée par ledit monomère M1 ou oligomère M1, fixé par sa première terminaison sur ladite molécule d'ancrage, et ledit monomère M2 ou oligomère M2, fixé sur une autre de ses terminaisons, et ledit procédé étant caractérisé en ce que ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine ou un oligomère de polyoléfine ou un polyalcène, avec au moins 5 unités de monomères, et de préférence entre 10 et 50 unités de monomères, ladite chaîne polyoléfine étant une chaîne ramifiée, et de préférence une chaîne de polyisobutène.

Ainsi, on peut ajouter par couplage un nième monomère Mn ou oligomère Mn ; ce procédé permet de synthétiser des macromolécules.

Le procédé comprend au moins une étape dans laquelle ladite macromolécule fixée sur ladite molécule d'ancrage est séparée du milieu réactionnel par la technique d'extraction liquide-liquide dans un solvant organique apolaire avec un solvant polaire (ou un mélange de solvant polaire) immiscible. Le véritable défi est donc de conserver la solubilité sélective du monomère ou oligomère M1 ancré après les réactions de déprotection et de couplage par rapport aux sous-produits desdites réactions.

C'est le caractère ramifié de la chaîne polyoléfine de la molécule d'ancrage qui confère à cette dernière son excellente solubilité dans des solvants apolaires et sa très faible solubilité dans des solvants polaires, qui sont nécessaires pour permettre une séparation de la molécule d'ancrage du milieu réactionnel par extraction liquide-liquide.

Le procédé peut comporter une étape dans laquelle ladite macromolécule est totalement déprotégée. Après le couplage du dernier monomère ou oligomère, on procède à l'élimination des groupes protecteurs de la macromolécule.

Lesdites unités de monosaccharides ou dérivés de monosaccharides sont notamment des dérivés de pentoses (et notamment des nucléosides) ou d'hexoses. Parmi les pentoses on peut citer par exemple les nucléosides, tels que les C-nucléosides, les nucléosides acycliques, les nucléosides carboxyliques, les imino-C-nucléosides, les nucléosides ayant des bases modifiées ; toutes ces molécules doivent être utilisées sous une forme convenablement protégée. D'autres dérivés de monosaccharides utilisables sont les

osamines (sucres aminés), tels que la glucosamine, la galactosamine, la mannosamine, la méglumine.

La liaison entre deux unités successives est une liaison de type osidique (et de
5 préférence de type glycosidique ou de type phosphorylé (notamment de type ose-1-phosphate) ou de type glucidique ou de type N-hétéroside ou de type S-hétéroside.

Dans un mode de réalisation du procédé, certaines des unités U peuvent ne pas être des
monosaccharides ou des dérivés de monosaccharides. En particulier, ces unités U
10 peuvent être sélectionnées parmi les acides aminés et les lipides (dérivés de l'isoprène).

Ladite molécule d'ancrage présente avantageusement une masse moléculaire moyenne
en masse comprise entre 300 et 20 000, et de préférence entre 500 et 15 000. Sa chaîne
polyoléfine est un oligomère ou un polymère construit à partir de monomères qui sont de
15 préférence identiques.

Dans un mode de réalisation avantageux, ladite chaîne polyoléfine ou oligomère de
polyoléfine ou polyalcène a été obtenue par polymérisation d'un monomère. Ce
monomère est avantageusement biosourcé.

20 Dans un mode de réalisation particulier, ladite chaîne polyoléfine ou oligomère de
polyoléfine ou polyalcène comprend un nombre de liaisons carbone-carbone insaturées
ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %.

25 Un deuxième objet de l'invention est l'utilisation d'un procédé selon l'un quelconque des
modes de réalisation de l'invention pour la synthèse d'oligonucléotides ou
d'oligosaccharides.

Dans le cas d'oligonucléotides, l'unité monomérique est typiquement constituée d'un
30 nucléoside (ou d'une chaîne d'oligonucléotide) phosphorylé convenablement protégé
(schéma 1). Cette unité va réagir avec l'alcool en position 5' d'un nucléoside (ou d'une
chaîne d'oligonucléotide) convenablement protégé sur la base nucléique et/ou en position
2' du sucre et ancré en position 3' sur un support liquide.

35 [Chem 1]

12

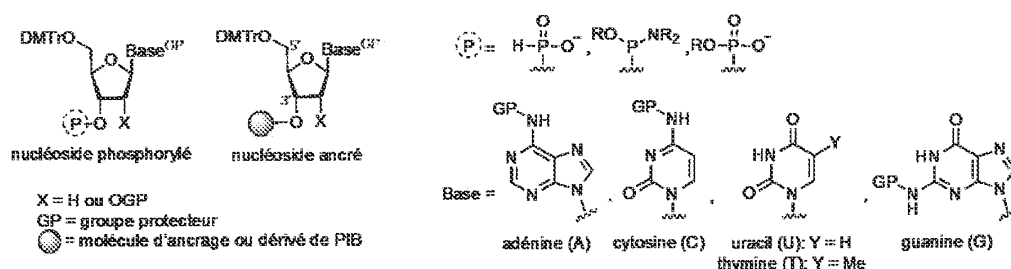


Schéma 1

Dans le cas d'oligosaccharides, l'unité monomérique est typiquement constituée d'un glycosyl donneur (ou d'une chaîne d'oligosaccharide) convenablement protégée ou non et porteuse d'un groupement Z, en position anomérique, qui peut être sans s'y limiter un hémiacétal cyclique, un acétate, un thioglycoside, un phosphate ou un imidate. La fonction alcool d'un glycoside accepteur (ou d'une chaîne d'oligosaccharide) convenablement protégé ou non et ancré sur un support liquide va réagir avec la dite unité monomérique (schéma 2).

10

[Chem 2]

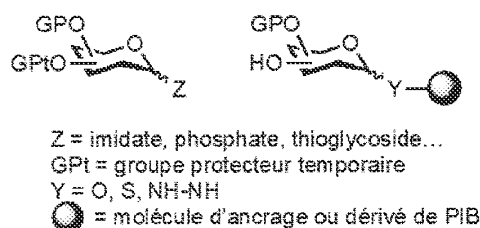


Schéma 2

- 15 D'une manière générale, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre avec des unités identiques ou différentes. A titre d'exemple, on peut ainsi synthétiser un oligosaccharide qui est un homopolymère, c'est-à-dire qui est constitué d'unités de monosaccharide identiques. On peut aussi synthétiser un oligosaccharide à partir d'unités de monosaccharides différentes. On peut également utiliser des unités qui sont des disaccharides, des trisaccharides ou des oligosaccharides plus longs.
- 20 De même, on peut synthétiser des oligonucléotides à partir d'unités de nucléoside phosphorylé (ou oligonucléotide) identiques ou différentes.

- A titre d'exemple, pour préparer des oligonucléotides, les nucléosides 3'(2-cyanoéthyl-N,N-dialkylphosphoramidite) ou les nucléosides 3'-(H-phosphonates) ou les nucléosides phosphates (di ou triesters), peuvent être utilisés. Dans la synthèse d'oligosaccharides on

25

peut utiliser des glycosyls donneurs convenablement protégés ou non. Dans les deux cas, on applique les réactions de couplages connues de l'homme du métier.

Le procédé selon l'invention permet aussi de synthétiser des polysaccharides mixtes comportant des unités de monosaccharide et des unités de nucléotide.

Le procédé selon l'invention permet également d'introduire dans la macromolécule des unités qui ne sont ou ne comprennent ni des oligosaccharides ni des oligonucléotides.

Une caractéristique essentielle du procédé selon l'invention est l'utilisation de molécules d'ancrage ou molécules solubilisantes ou matrices d'ancrage. Elles doivent être solubles dans un solvant apolaire. Elles sont constituées d'une chaîne polyoléfine ayant au moins 5 unités de monomères, et de préférence entre 10 et 50 unités ; ce sont des polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polyalcènes. Avantageusement, les molécules d'ancrage sont fonctionnalisées à au moins l'une de leurs extrémités pour permettre la protection ou la fixation de l'unité de monomère (ou oligomère) initiale.

Ladite molécule d'ancrage peut comprendre dans chacune de ses unités des groupes alkyles identiques ou non, qui sont de préférences sélectionnées dans le groupe formé par le méthyle et l'éthyle. Ladite chaîne polyoléfine présente avantageusement une masse moléculaire moyenne en masse comprise entre 300 et 20 000, et de préférence entre 500 et 15 000. Ladite chaîne polyoléfine peut comprendre un nombre de liaisons carbone-carbone insaturées ne dépassant pas 5 %, et de préférence ne dépassant pas 3 %. De préférence il s'agit d'une chaîne de polyisobutène (en abrégé PIB). Le schéma 3 montre certains PIB utilisables dans le cadre de l'invention ; dans ces formules, X représente un espaceur qui porte la fonction vouée à réagir avec la première unité U1 de la macromolécule pour réaliser l'ancrage sur le support liquide.

[Chem 3]

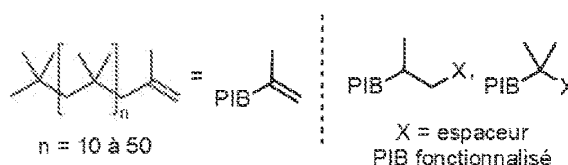


Schéma 3

30

Le procédé selon l'invention permet d'accéder à des macromolécules de haute pureté. Ce procédé induit un facteur E (facteur environnemental) avantageux du fait que les purifications se font par la technique d'extraction liquide-liquide, avec des quantités de

solvant raisonnables, ce qui permet de minimiser les étapes de purifications par colonnes de chromatographie ; engendrant, en conséquence, des économies financières. Ainsi, des réactions permettant de dériver des sous-produits solubles dans des solvants apolaires peuvent être effectuées avant l'extraction liquide-liquide.

5

Dans un mode de réalisation particulier, ladite molécule d'ancrage comporte une chaîne polyoléfine (ou est une chaîne polyoléfine) terminée par au moins un groupement sélectionné dans le groupe (espaceur) formé par une chaîne aliphatique (ramifiée ou non et insaturée ou non), un (hétéro)cycle et/ou un (hétéro)aryle (substitué ou non).

10

Dans un mode de réalisation avantageux, la masse moléculaire moyenne en masse des molécules d'ancrage, hormis leur fonctionnalisation terminale, est comprise entre 300 et 20 000, et de préférence entre 500 et 15 000. Au-delà d'une masse moléculaire moyenne en masse d'environ 20 000, ces molécules peuvent présenter une viscosité trop grande, ce qui risquerait de limiter leur solubilité dans les solvants organiques.

15

Certains dérivés de PIB utilisés dans le cadre de la présente invention sont disponibles dans le commerce en tant que ligands pour la catalyse homogène. A titre d'exemple, on peut utiliser le 2-méthyl-3-[polyisobutyl (12)]propanol (masse moléculaire moyenne en masse 757, y compris la fonctionnalisation terminale) ou le 4-[polyisobutyl(18)]phénol (masse moléculaire moyenne en masse 1104, y compris la fonctionnalisation terminale) qui sont distribués, respectivement, sous les références 06-1037 et 06-1048 par la société Strem Chemicals. Ces deux molécules sont des dérivés de polyisobutènes dont la chaîne est terminée, respectivement, par un groupement $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{H})-\text{CH}_2-\text{OH}$ (i.e. isopropanol) et par un groupement $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ (i.e. phénol).

20

Selon une caractéristique de l'invention, les molécules d'ancrage agissent comme des groupes protecteurs, des fonctions alcools et/ou de toutes autres fonctions nécessitant d'être inertes dans les conditions du procédé qui fait l'objet de la présente invention.

30

Dans le cas de la synthèse d'oligonucléotides, la fonction alcool en position 3' du ribose/désoxyribose et/ou une amine de la base nucléique peuvent être masquées, simultanément ou non, avec au moins un groupe protecteur solubilisant.

Dans le cas de la synthèse d'oligosaccharides, la fonction anomérique initiale est ancrée (protégée) avec un groupe protecteur solubilisant.

35

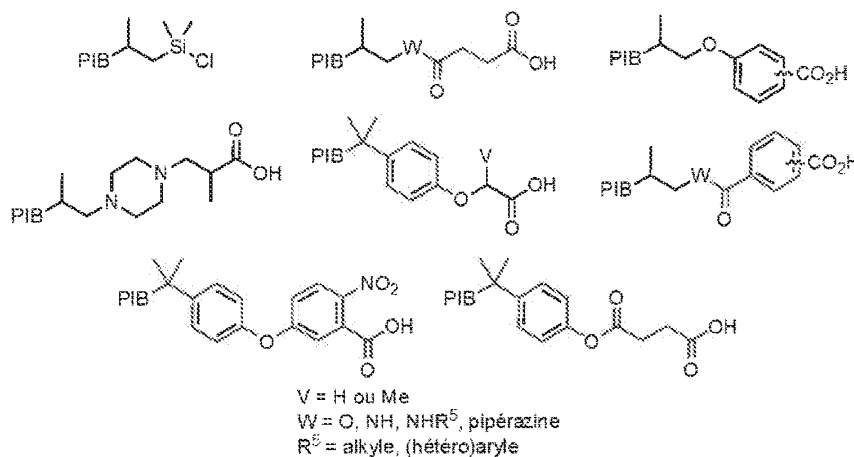
Ces dérivations permettent la solubilisation des monomères et des oligomères dans des solvants apolaires tels que le cyclohexane, l'heptane(s) ou l'hexane(s).

Selon une autre caractéristique de l'invention, l'utilisation de molécules d'ancrage solubles dans des solvants organiques comme décrit ci-dessus (et plus particulièrement l'utilisation de polyoléfines), et insoluble dans certains solvants polaires (tels que l'eau et/ou l'éthanol et/ou l'acétonitrile), facilite la purification des monomères et des oligomères ancrés par simple extraction liquide-liquide ou simple filtration sur silice.

10 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on utilise des molécules d'ancrage disponibles dans le commerce, ou encore des molécules d'ancrage synthétisables de façon simple et directe à partir de précurseurs disponibles dans le commerce, notamment certains dérivés de polyisobutènes. En d'autres termes, les groupes protecteurs classiques peuvent être liés au PIB, tels que les dérivés benzyle, silyle ou acide carboxylique.

Le schéma 4 ci-dessous présente quelques structures, non exhaustives, capables de jouer le rôle de groupe protecteur dans la synthèse d'oligonucléotides.

[Chem 4]



20

Schéma 4

Le schéma 5 ci-dessous présente quelques structures, non exhaustives, capables de jouer le rôle de groupe protecteur dans la synthèse d'oligosaccharides.

25 [Chem 5]

16

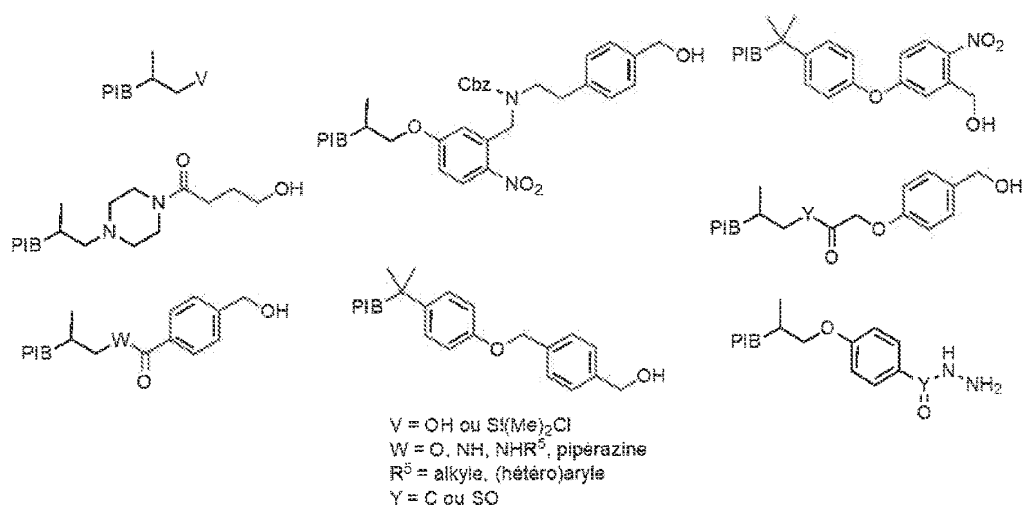


Schéma 5

5 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on fixe le monomère (ou oligomère) initial à la molécule d'ancrage selon des réactions connues en fonction des fonctions chimiques dans un solvant approprié, tels que des mélanges de solvants (halogénés ou non), et à une température comprise entre - 50°C et 150°C.

10 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les fonctions chimiques du monomère (ou oligomère), incompatibles avec ce procédé, peuvent être temporairement masquées par des groupes protecteurs appropriés tels que le *tert*-butyldiméthylsilyle (abrégé TBDMS ou TBS), le diméthoxytrityle (abrégé DMTr) ou tout autre groupe protecteur compatible avec le présent procédé.

15 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, après l'étape de déprotection, les groupes protecteurs peuvent être dérivés, de préférence *in situ*, pour former des composés solubles dans un solvant polaire (ou un mélange de solvant polaire). Ainsi, le monomère (ou oligomère) ancré sur un dérivé de PIB dont l'alcool primaire est protégé par un groupe trityle est clivé en milieu acide en présence d'un agent piégeant (scavengers) du carbocation correspondant (trityle) permettant de le rendre soluble en phase aqueuse (ou polaire). Les agents piégeants du carbocation trityle comprennent sans s'y limiter l'acide thioglycolique, l'acide 3-mercaptopropionique, l'acide 3-mercaptopropanesulfonique, la cystéine ou l'acide thiomalique (ou acide mercaptosuccinique).

20

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, ladite molécule d'ancrage réagit avec un premier monomère (ou oligomère) convenablement protégé, conduisant à une liaison covalente, telle qu'une liaison ester ou O-glycoside, entre ces deux espèces moléculaires.

5

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les monomères ayant des fonctions chimiques incompatibles avec les conditions réactionnelles du cycle d'élongation (ou itération) peuvent être temporairement masquées par un groupement protecteur solubilisant. Dans ce cas, selon la longueur de la macromolécule cible, les fonctions chimiques peuvent être masquées par un ou plusieurs groupes protecteurs solubilisant et par un ou plusieurs groupes protecteurs classiques tels que : le benzoyle, l'acétyle, le *tert*-butyldiméthylsilyle.

10

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, le procédé de synthèse de macromolécules est opéré en utilisant des unités de monomères (ou oligomères) liées à une molécule d'ancrage comme point de départ.

15

Dans le cas de la synthèse d'oligonucléotides, le premier cycle d'élongation commence par une déprotection sélective en milieu acide et en présence d'un agent piègeant, s'il s'agit d'un dérivé trityle, du groupe protecteur en position 5' du nucléoside ancré.

20

Dans le cas de la synthèse d'oligosaccharides, le premier cycle d'élongation commence par une réaction entre un glycosyl donneur convenablement protégé ou non et un glycoside ancré et déprotégé sur la fonction alcool qui va être engagée dans la réaction. Là aussi, si le groupement protecteur est un dérivé trityle, il est déprotégé en milieu acide en présence d'un agent piègeant.

25

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, l'intégration d'une unité (ou itération) de monomère nécessite plusieurs étapes.

Dans le cas de la synthèse d'oligonucléotides, deux étapes sont nécessaires s'il s'agit de nucléosides phosphate (couplage et déprotection de l'alcool en position 5'), et trois étapes s'il s'agit de nucléosides phosphoramidites ou H-phosphonates (couplage, oxydation et déprotection de l'alcool en position 5').

30

Dans le cas de la synthèse d'oligosaccharides, deux étapes sont nécessaires (couplage et déprotection).

35

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, ladite macromolécule est formée de n unités de monomère dont une fonction chimique est liée sur une molécule d'ancrage. Au cours du déroulement du procédé, la chaîne d'oligomère grandit par élongation (ou cycle) successive ou itération, et pendant chacune de ces étapes on ajoute une unité de

5 monomère ou oligomère, à l'extrémité de l'alcool libre.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on peut utiliser dans ladite chaîne d'oligomères des monomères (ou oligomères) naturels et/ou non naturels et/ou synthétiques.

10 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, on peut utiliser dans la ladite chaîne d'oligomères une ou plusieurs unités d'analogues de monomères (ou d'oligomères) convenablement protégées tels les monomères morpholino-phosphorés ou les monomères N-Acétyl monosaccharides.

15 Selon encore une autre caractéristique de l'invention, au moins une étape dans laquelle ladite chaîne d'oligomère est purifiée du milieu réactionnel par extraction dans un solvant organique apolaire non miscible à l'eau (ou non miscible à un mélange eau/éthanol ou un mélange eau/acétonitrile) ou par filtration sur silice. Comme solvant organique apolaire on

20 préfère les hydrocarbures ne comportant que des atomes de carbone et d'hydrogène, tels que les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes, et on préfère en particulier le cyclohexane, les heptanes et les hexanes.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, le procédé permet d'obtenir des

25 oligomères de haute pureté, après déprotection totale et décrochage des molécules d'ancrage, pour être utilisés selon leur destination, par exemple en tant que principe actif pour des essais précliniques, des soins cliniques ou toutes autres applications.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les molécules d'ancrage peuvent

30 être réutilisées (recyclées) dans le procédé selon l'invention.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, les solvants d'extraction peuvent être réutilisés (recyclés) dans le procédé selon l'invention.

35 Le procédé selon l'invention peut être automatisé et/ou réalisé en chimie de flux.

Description détaillée

Dans la présente invention, les termes ci-dessous sont utilisés avec la signification suivante, qui est en accord avec la terminologie de l'Union Internationale pour la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), et d'éventuels autres termes utilisés doivent également être
5 compris tels que définis par IUPAC.

Le terme « glucide » (en anglais « carbohydrate ») comprend les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides ainsi que les composés dérivés des monosaccharides par réduction de la fonction carbonyle (notamment de la fonction aldéhyde ou cétone), par oxydation d'au moins un groupe fonctionnel à l'extrémité de la
10 chaîne en acide carboxylique ou par remplacement d'un ou plusieurs groupes hydroxyle par un atome d'hydrogène, un groupe amino, un groupe thiol ou par tout atome similaire. Ce terme inclut également les dérivés de tels composés.

Le terme « monosaccharide » désigne le monomère des glucides.

Le terme « glycosylamine » signifie un composé dans lequel un glucide est lié à un
15 groupement amine en position anomérique.

Le terme « nucléoside » désigne un dérivé de type ribosyl ou déoxyribosyl de certaines bases de type pyrimidine ou purine, et plus précisément des glycosylamines constituées d'une base nucléique liée à l'atome de carbone anomérique d'un résidu de pentose, généralement du ribose (ribonucléoside) ou du déoxyribose (désoxyribonucléoside), par
20 une liaison glycosidique depuis l'atome d'azote N¹ d'une pyrimidine ou l'atome N⁹ d'une purine.

Le terme « nucléotide » désigne une molécule organique qui est l'élément de base d'un acide nucléique tel que l'ADN ou l'ARN ; cette molécule est composée d'une base nucléique, d'un ose à cinq atomes de carbone, et enfin d'un à trois groupe phosphate.

25 Le terme « groupe protecteur » désigne une molécule utilisée pour la protection réversible d'un groupe fonctionnel pendant une réaction chimique pour rendre ledit groupe fonctionnel non réactif dans ledit processus de réaction chimique qui aurait transformé ledit groupe fonctionnel non protégé.

Le terme « groupe fonctionnel » signifie un atome ou groupe d'atomes qui peut réagir
30 avec d'autres groupes fonctionnels. Des exemples de groupes fonctionnels sont les groupes suivants : aldéhyde, acide carboxylique, acide phosphorique, acide phosphonique, acide sulfonique, amine (primaire ou secondaire), cétone, halogénure d'alkyle, hydrazine, hydroxylamine, hydroxyle, isocyanate, isothiocyanate, thiol.

Le terme « macromolécule » désigne une molécule de masse moléculaire élevée conçue
35 à partir d'une succession d'unités de faible masse moléculaire. Ces unités peuvent être enchaînées individuellement et successivement pour former une chaîne ; on peut aussi

coupler un oligomère comportant plusieurs de ces unités. D'une manière générale ces unités peuvent être identiques ou différentes. Les macromolécules peuvent être d'origine synthétique, biologique ou une combinaison des deux. Elles peuvent comprendre un ou plusieurs groupes fonctionnels. Le terme « macromolécule » tel qu'utilisé ici comprend les polymères ; dans le cas d'un polymère, ladite unité est appelée un monomère.

Le terme « polymère » désigne une macromolécule comprenant des unités structurales répétitives, c'est-à-dire des monomères, reliés par des liaisons chimiques de manière linéaire, circulaire, ramifiée, réticulée, dendrimérique ou une combinaison de ceux-ci. Il est entendu qu'un polymère peut par exemple également comprendre au moins un groupe fonctionnel. Un polymère est appelé « homopolymère » si le polymère est composé des mêmes monomères et est appelé « copolymère » si le polymère est composé de monomères différents.

Selon une caractéristique de l'invention, qui sera décrite en plus grand détail ci-dessous, les molécules d'ancrage ou groupes protecteurs solubilisant ou matrice d'ancrage sont des polyoléfines, ou plus précisément des oligomères de polyoléfines (les polyoléfines étant appelées aussi polyalcènes) et leurs dérivés, c'est-à-dire qu'ils portent au moins un groupe fonctionnel.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention utilise des polyoléfines, ou plus précisément des oligomères de polyoléfines (les polyoléfines étant appelées aussi polyalcènes), et leurs dérivés comme molécule d'ancrage ou groupement protecteur ou matrice d'ancrage, de plusieurs groupes fonctionnels de divers monomères, au moins monofonctionnelle, liés par une liaison covalente (ester, amide, éther, thioether ou toutes autres fonctions chimiques adéquates), rendant le nouveau dérivé monomérique soluble en phase liquide apolaire. Les molécules de polyoléfines comprennent une chaîne d'atomes de carbone reliés par des liaisons simples. Elles peuvent comprendre des ramifications constituées de groupements alkyles identiques ou différents, mais de préférence identiques. De préférence, les polymères sont constitués d'un nombre d'unités de monomères d'au moins 10 et de préférence compris entre 15 et 50. Les homopolymères sont préférés mais, des copolymères (saturés ou non) peuvent être utilisés. Dans le cas de polymères ou copolymères insaturés le nombre de liaisons insaturées dans la chaîne d'atomes de carbone ne dépasse avantageusement pas 5 %, et préférentiellement ne dépasse pas 3 %.

35

Dans un mode de réalisation préféré, il s'agit de dérivés de polyisobutènes (PIB), une classe de polymères connue depuis les années 30 du siècle dernier, mais on peut également utiliser des dérivés de polypropylènes.

- 5 Ces molécules d'ancrage employées dans le procédé selon l'invention sont de préférence sous la forme de dérivés fonctionnalisés. Les schémas 4 et 5 précédents montrent un certain nombre de dérivés de PIB avec leurs fonctionnalisations qui conviennent pour l'exécution de la présente invention.
- 10 Selon une caractéristique de l'invention, ces molécules d'ancrage sont liées à une unité de monomère (ou oligomère), par une liaison covalente telle qu'amide, éther, thioéther, ester thioester, sulfonylhydrazide ou acylhydrazide (liste non exhaustive). Cela suppose que les dérivés de PIB engagés soient convenablement fonctionnalisés. Cette fonctionnalisation des molécules d'ancrage est en règle générale en position terminale,
- 15 c'est-à-dire de préférence à l'une des extrémités de la chaîne d'atomes de carbone.

- Selon l'invention, les monomères (ou oligomères) multifonctionnelles peuvent être fonctionnalisés avec des dérivés de PIB via une liaison covalente, sous la forme d'ester, d'éther, de thioéther, de thioester ou toutes autres fonctions chimiques compatibles avec
- 20 le présent procédé. Cela revient à jouer un rôle de groupement protecteur solubilisant des monomères (ou oligomères).

- Les oligomères de polyoléfines utilisées comme molécules d'ancrage sont typiquement caractérisés par une masse moléculaire moyenne en masse, mais on peut également
- 25 utiliser des oligomères « purs » qui comportent des molécules identiques d'une longueur de chaîne donnée.

- La réaction entre la molécule d'ancrage et le monomère (ou oligomère) conduit à une nouvelle molécule dont la solubilité dans l'eau est faible (< 30 mg/ml).
- 30

- Selon une autre caractéristique de l'invention, la fonctionnalisation du PIB, par des réactions chimiques, conduit à diverses structures moléculaires, susceptibles de jouer le rôle de groupements protecteurs solubilisants, d'une molécule (ou intermédiaire) d'intérêt, au moins bifonctionnelle, lors d'une synthèse multi-étapes. Il est sous-entendu que le
- 35 groupe protecteur est lui aussi au moins monofonctionnel. Dans le cas contraire, la fonction chimique non impliquée dans la liaison entre le dérivé de PIB et la molécule (ou

intermédiaire) d'intérêt doit être inerte ou convenablement protégée, pour éviter tous produits parasites ou réactions secondaires.

Selon une autre caractéristique de l'invention, les fonctions chimiques du monomère (ou de l'oligomère) non impliquées dans la liaison covalente avec le dérivé de PIB, directement ou non, doivent être passives ou convenablement protégées, pour éviter la formation de produits indésirables.

Dans un aspect supplémentaire de l'invention, la molécule issue de la réaction entre le dérivé de PIB et un monomère (ou oligomère), via la formation d'une liaison covalente, directement ou non, est caractérisée en ce qu'il a une faible solubilité dans l'eau (< 30 mg/ml). C'est en ce sens que le dérivé de PIB agit comme une molécule solubilisante.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la molécule issue de la réaction entre le dérivé de PIB et un monomère (ou oligomère), via la formation d'une liaison covalente, directement ou non, est caractérisée en ce que le dérivé de PIB augmente de manière significative la solubilité du monomère (ou oligomère) dans des solvants apolaires (cyclohexane, heptane(s), hexane(s) ou des solvants aromatiques) ou tout autre solvant adéquat. Ainsi, le nouveau dérivé monomérique (ou oligomérique) a une solubilité sélective (un haut coefficient de partage) pour un solvant apolaire lors d'une extraction liquide-liquide (en présence d'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile), rendant le processus de purification simple, rapide et peu coûteux.

La réaction de protection entre le dérivé de PIB et un monomère (ou oligomère), via la formation d'une liaison covalente, directement ou non (espaceur), s'effectue dans tout solvant ou liquide inerte qui peut dissoudre les réactifs, à une température appropriée. Les solvants applicables, purs ou en mélanges, comprennent, sans s'y limiter, les hydrocarbures halogénés ou non. Les solvants préférés sont le dichlorométhane et le toluène (seul ou en présence de N-N-diméthylformamide).

Selon les fonctions chimiques libres du monomère (ou de l'oligomère) et la molécule d'ancrage, diverses réactions chimiques sont possibles. La formation du nouveau dérivé de monomère ou d'oligomère peut donc être réalisée selon toutes les méthodes connues de l'homme du métier. A titre d'exemples, non exhaustifs, les réactions applicables comprennent les réactions d'estérifications, les réactions d'amidations ou les réactions d'éthérifications. En conséquence, les conditions réactionnelles (solvant(s),

température(s), concentration(s), durée(s)) doivent être adaptées pour chaque réaction de protection.

5 Selon la nature chimique de la liaison entre le monomère (ou l'oligomère) et la molécule d'ancrage, les étapes de déprotections pourront être réalisées en utilisant des conditions réactionnelles connues par l'homme du métier. Sans être exhaustif, on peut citer la saponification, l'hydrolyse, l'hydrogénolyse. Plus précisément, le procédé de solubilisation d'un monomère (ou d'un oligomère) convenablement protégé(s) et ancrés, via une liaison covalente, selon l'invention, est caractérisé en ce qu'on le solubilise dans un solvant
10 organique. C'est en ce sens que la molécule d'ancrage agit comme une molécule solubilisante et un groupe protecteur d'une fonction chimique du monomère (ou d'un oligomère).

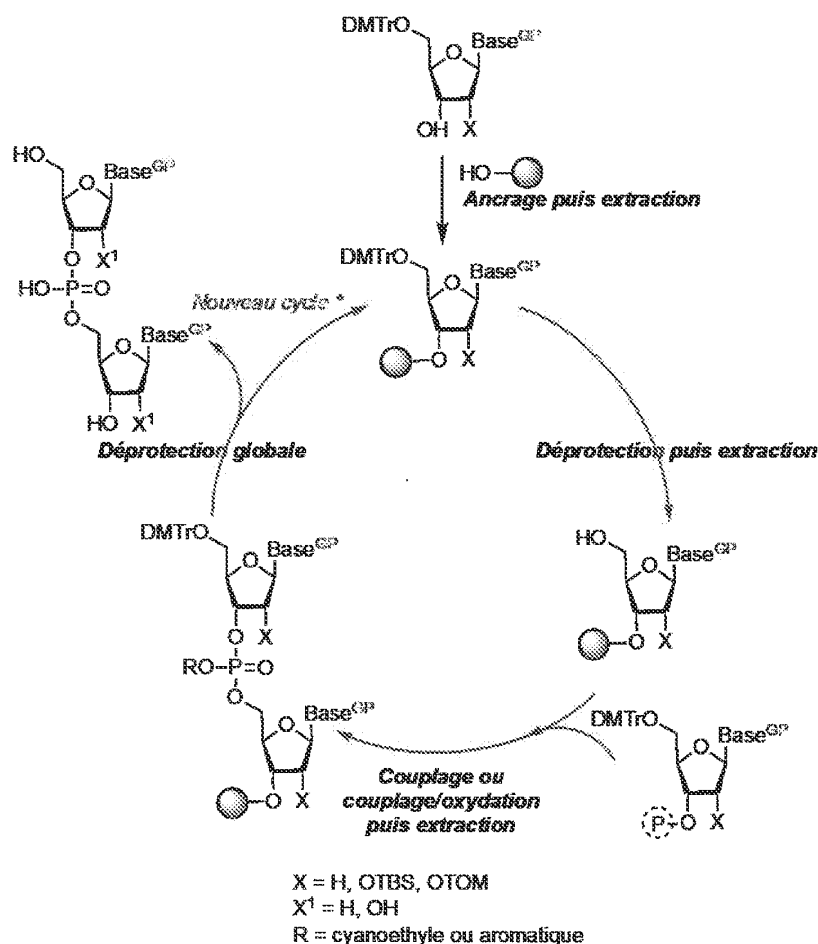
Le monomère (ou oligomère), convenablement protégé et lié à une molécule d'ancrage
15 de façon covalente (de diverses natures), est caractérisé en ce que sa solubilité dans l'eau est faible (< 30 mg/ml). C'est en ce sens que le matrice d'ancrage agit comme une entité solubilisante. Cette dérivation augmente de manière significative la solubilité de la nouvelle molécule à tel point qu'elle devient soluble dans des solvants organiques apolaires. En conséquence, les monomères (ou oligomères) ancrés sur un dérivé de PIB
20 ont un haut coefficient de partage (solubilité sélective (ou distribution sélective)) pour la phase organique apolaire lors d'une extraction liquide-liquide en présence de cyclohexane ou heptane(s) ou hexane(s) et d'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile, permettant ainsi une purification simple et rapide.

25 La présente invention ouvre la possibilité de synthèse convergente d'oligomères longs, qui peut être réalisée en utilisant au moins deux fragments d'oligomères convenablement protégés, dont un au moins est lié à une molécule d'ancrage.

Le schéma réactionnel 6 ci-dessous montre une séquence complète pour produire un
30 oligonucléotide. Plus précisément, dans une première étape appelée ancrage, une première unité de monomère (en l'occurrence un dérivé de désoxyribose) protégée par un groupe protecteur (en l'occurrence le DMTr) est fixée sur une molécule de support liquide selon l'invention ; le produit obtenu est purifié par extraction liquide-liquide. Dans une deuxième étape appelée déprotection, le groupe protecteur (DMTr) est ôté et piégé en
35 milieu acide en présence d'un scavenger et le produit obtenu est purifié par extraction

liquide-liquide. Il est préférable de réaliser l'ancrage et la déprotection (avec piégeage) sans isolation de l'alcool protégé intermédiaire.

[Chem 6]



5

Schéma 6 : Synthèse d'oligonucléotides.

Après l'étape de déprotection, les groupes protecteurs peuvent être dérivés, de préférence *in situ*, pour former des composés solubles dans un (ou mélange de) solvant polaire. Ainsi, le monomère (ou oligomère) ancré sur un dérivé de PIB dont l'alcool primaire est protégé par un groupe trityle est clivé en milieu acide en présence d'un agent piégeant (scavenger) du carbocation correspondant (trityle) permettant de le rendre soluble en phase aqueuse (ou polaire). Les agents piégeants du carbocation trityle peuvent avantageusement être sélectionnés dans le groupe formé par : l'acide thioglycolique, l'acide 3-mercaptopropionique, l'acide 3-mercapto-1-propanesulfonique, la

10

15

cystéine, l'acide thiomalique, l'acide mercaptosuccinique. Un exemple de cette déprotection est représenté sur le schéma 7 ci-dessous.

[Chem 7]

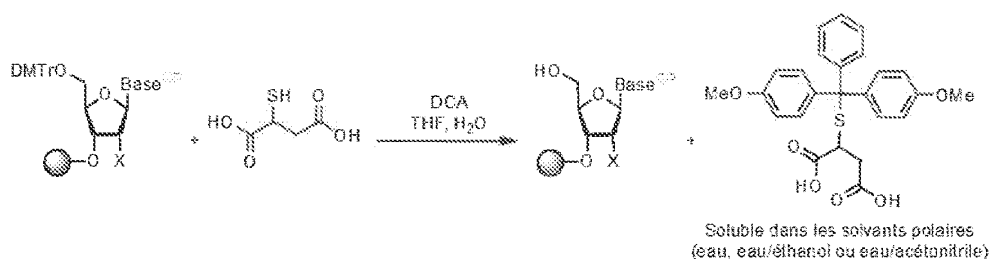


Schéma 7 : Déprotection d'un groupe protecteur DMTr

Dans une troisième étape appelée couplage/oxydation (sulfuration), on introduit une deuxième unité de monomère (en l'occurrence un dérivé phosphorylé de ribose) protégée par un groupe protecteur (en l'occurrence le DMTr). Dans le cas de la chimie des phosphoramidites, la réaction de couplage s'effectue en présence de tétrazole ou tout autres réactifs appropriés (benzylthio-1*H*-tétrazole (BTT), 4,5-dicyanoimidazole), suivie d'une réaction d'oxydation (acide métachloroperbenzoïque (mCPBA), iode, 2-butanone peroxyde). On obtient ainsi un dinucléotide ; les réactifs et produits secondaires sont séparés par extraction.

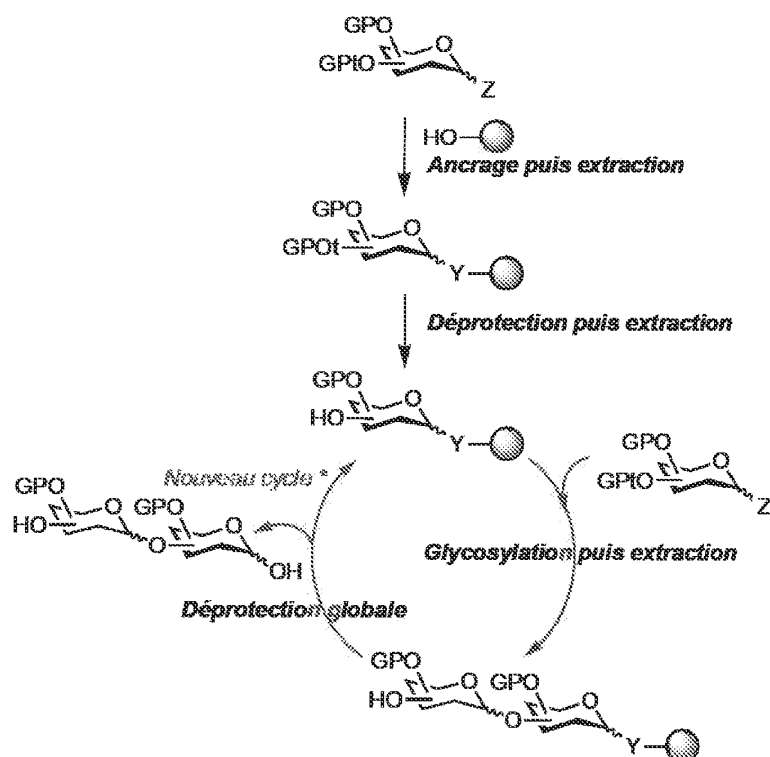
Dans une quatrième étape appelée déprotection générale, ce dinucléotide, qui est encore lié à la molécule de support liquide selon l'invention, peut être déprotégé puis détaché de ce support. Alternativement, il peut entrer dans un nouveau cycle pour l'ajout d'une troisième unité, et ainsi de suite.

Le schéma réactionnel 8 ci-dessous montre une séquence complète pour produire un oligosaccharide. Plus précisément, dans une première étape appelée ancrage, une première unité de monomère (en l'occurrence un dérivé d'hexose) protégée ou non par un premier groupe protecteur, plus résistant (GP) et par un deuxième groupe protecteur ou non, plus labile, dit temporaire (GPt) est fixée sur une molécule de support liquide sur la position anomérique selon l'invention ; ce composé est purifié par extraction. Dans une deuxième étape appelée déprotection sélective, ledit deuxième groupe protecteur (GPt) est enlevé puis le composé est purifié par extraction. Dans une troisième étape appelée glycosylation, une deuxième unité de monomère (en l'occurrence un dérivé de glycosyl donneur protégé ou non) est ajoutée et couplée à ladite première unité pour former un

disaccharide ancré ; les réactifs et produits secondaires sont éliminés par extraction liquide-liquide. Dans une quatrième étape appelée déprotection globale, ce disaccharide est déprotégé puis séparé du support liquide. Alternativement, il peut entrer dans un nouveau cycle, après déprotection sélective d'un groupe fonctionnel, s'il y a lieu, pour

5 initier un nouveau cycle, et ainsi de suite.

[Chem 8]



10

Schéma 8 : Synthèse d'oligosaccharides.

Parmi les molécules d'ancrage, on préfère celles qui sont susceptibles d'être fabriquées par une technique de polymérisation à partir de monomères simples. Tel est le cas des polyisobutènes (PIB), qui représentent un type de molécules d'ancrage particulièrement

15 préféré. Le monomère des polyisobutènes, à savoir l'isobutène, peut être fabriqué de manière industrielle à partir de matières premières biosourcées, et les PIB peuvent être préparés à partir de l'isobutène biosourcé par simple polymérisation. Ainsi, la présente invention peut être mise en œuvre avec des molécules d'ancrage biosourcées, et notamment avec du PIB biosourcé.

Le concept de la teneur biosourcée est défini dans la norme ISO 16620-1 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 1 : Principes généraux* », notamment par une définition des termes « polymère synthétique biosourcé », « teneur en polymère synthétique biosourcé », « teneur en carbone biosourcé » et « teneur en masse biosourcée », ainsi que dans les normes ISO 16620-2 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 2 : Détermination de la teneur en carbone biosourcé* » et ISO 16620-3 :2015 « *Plastiques – Teneur biosourcée – partie 3 : Détermination de la teneur en polymère synthétique biosourcée* », pour les méthodes de détermination et quantification du caractère biosourcé.

Avantageusement, les molécules d'ancrage utilisées dans le cadre de la présente invention présentent une teneur en carbone biosourcé supérieure à 90%, de préférence supérieure à 93%, et encore plus préférentiellement supérieure à 95%.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages.

Un premier avantage est qu'il permet d'obtenir des oligomères liés à une matrice avec une bonne pureté par simple extraction liquide-liquide dans un solvant organique apolaire et d'eau ou d'un mélange eau/éthanol ou encore eau/acétonitrile ou par filtration sur silice, provoquant l'élimination des sous-produits (sels, réactifs en excès ou toutes autres espèces moléculaires) qui ne sont pas liés aux dérivés de polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes. Des solvants organiques apolaires tels que le cyclohexane, l'heptane(s), l'hexane(s) qui ont des points éclair $< 15^{\circ}\text{C}$, sont appropriés pour solubiliser les dérivés de polyoléfines ou d'oligomères de polyoléfines ou polycènes pendant l'extraction ou le lavage. Le procédé selon l'invention permet donc de faciliter les étapes de purification et de produire moins de déchets (effluents et phase stationnaire).

Un second avantage, particulièrement intéressant, est la possibilité d'automatiser le procédé selon l'invention.

Un troisième avantage est la possibilité de recycler les solvants d'extractions ainsi que les molécules d'ancrage (polyoléfines ou oligomères de polyoléfines ou polycènes), notamment à l'échelle industrielle. En effet, ces groupes protecteurs peuvent être facilement retirés en fin de synthèse par des réactions habituellement utilisées en synthèse organique (telles que l'hydrolyse, la saponification, l'hydrogénolyse ou toute

autre réaction compatible avec le présent procédé) et recyclés. Ceci prouve que le procédé selon l'invention est en adéquation avec la chimie verte ou durable, contrairement aux méthodes de production actuelles.

- 5 Un quatrième avantage de l'invention réside dans la possibilité d'accéder à des oligomères de grande taille, soit en modulant la taille de la molécule d'ancrage, soit en s'orientant vers la synthèse convergente, soit en introduisant une ou plusieurs molécule(s) d'ancrage sur des unités monomériques.
- 10 Un cinquième avantage est la possibilité de contrôler la pureté de l'oligomère en cours de synthèse, à chaque étape par les différentes techniques d'analyses telles que la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase liquide à haute performance, la résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone-13.
- 15 Un sixième avantage est la possibilité de mettre en œuvre, à l'échelle industrielle, sans équipements onéreux.

Grâce à leur haute pureté, les macromolécules produites par ce procédé peuvent être utilisées en tant que produits pharmaceutiques, produits cosmétiques, produits

20 phytosanitaires ou produits agroalimentaires, ou pour accéder à l'un quelconque de ces produits.

- Encore un autre avantage est que les molécules d'ancrage préférées, à savoir les dérivés de polyisobutène, peuvent être préparés à partir de l'isobutène biosourcé, comme cela a
- 25 été expliqué ci-dessus.

Exemples :

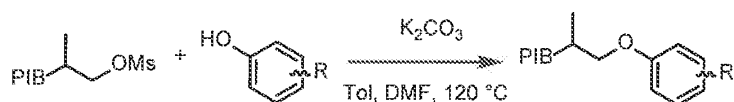
Les exemples suivants illustrent la synthèse de certaines molécules d'ancrage fonctionnalisées, utilisables pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention.

- 30 Sauf indication contraire, les dérivés de PIB connues ont été préparés à partir de précurseurs et procédés décrits (Tetrahedron, 2005, 61, 12081) et de réactifs commerciaux.

Exemple 1 : procédure générale d'O-arylation

- 35 [Chem 9]

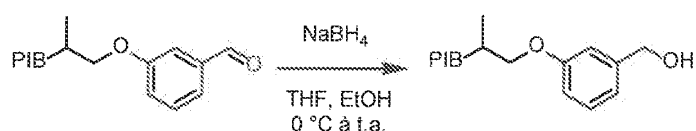
29



A un mélange du dérivé de PIB-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-OMs (1 équivalent) et du phénol (3 équivalents) dans un mélange toluène/*N,N*-diméthylformamide (1/1) (0.1 M), a été ajouté
 5 du carbonate de potassium (5 équivalents) puis le milieu réactionnel a été chauffé à 120 °C pendant 16 h puis refroidie à température ambiante. Le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane et au mélange acétonitrile/eau ou éthanol/eau (90/10), lavé à la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire au dérivé O-aryle
 10 correspondant.

Exemple 2 :

[Chem 10]

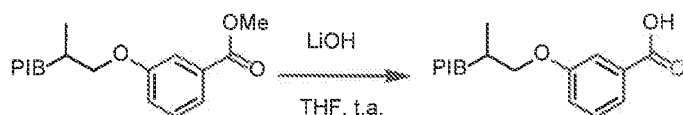


15

L'aldéhyde ancré (1 équivalent), a été dissout dans un mélange tétrahydrofurane/éthanol (1/1) (0.1 M) puis, refroidi à 0 °C pendant 5 minutes. Le borohydrure de sodium (3 équivalents) a été ajouté au milieu réactionnel (par petites portions) puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel
 20 a été concentré sous pression réduite puis, ont été successivement ajoutés au résidu une solution de soude 1N et du cyclohexane. La phase organique a ensuite été lavée à l'eau, à la saumure, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée sous pression réduite pour conduire à l'alcool benzylique correspondant.

25 Exemple 3 :

[Chem 11]

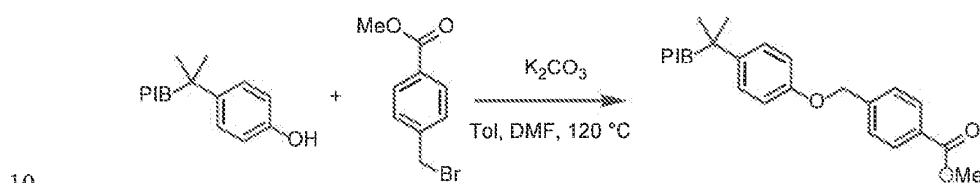


L'ester méthylique ancré (1 équivalent) a été dissout dans un mélange
 30 tétrahydrofurane/DMSO/eau (8/1/1) (0.1 M). L'hydroxyde de lithium (3 équivalents) est

ajouté au milieu réactionnel puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 h. Le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane et lavé successivement avec une solution d'acide chlorhydrique (1N), un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire à l'acide carboxylique correspondant.

Exemple 4 :

[Chem 12]

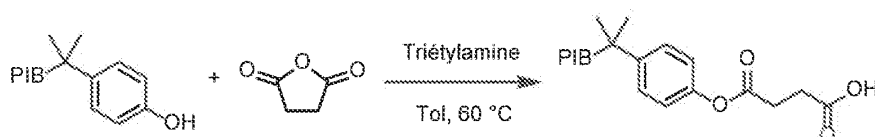


A un mélange du dérivé de PIB-phénol (1 équivalent) et de 4-(bromométhyl)benzoate de méthyle (3 équivalents) dans un mélange toluène/*N,N*-diméthylformamide (1/1) (0.1 M) a été ajouté du carbonate de potassium (5 équivalents) puis le milieu réactionnel a été chauffé à 120 °C pendant 16 h puis refroidie à température ambiante. Le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane et lavé successivement avec un mélange acétonitrile/eau ou éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire au dérivé O-aryle correspondant.

20

Exemple 5 :

[Chem 13]



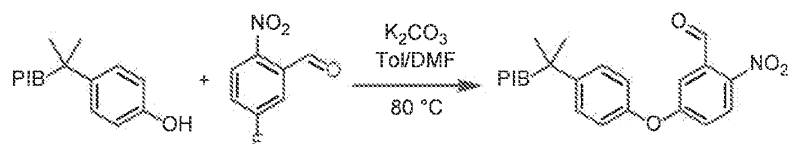
25 A une solution du dérivé PIB-phénol (1 équivalent) dans le toluène (0,1 M), sous agitation et à température ambiante, ont été ajoutés l'anhydride succinique (2 équivalents) puis, la triéthylamine (3 équivalents). Le milieu réactionnel a été chauffé à 60 °C pendant 16 h puis refroidi à température ambiante. Après ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (1N), le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane et la phase organique a été lavée successivement avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séchée

30

sur sulfate de sodium, filtrée, concentrée sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire à l'ester correspondant.

Exemple 6 :

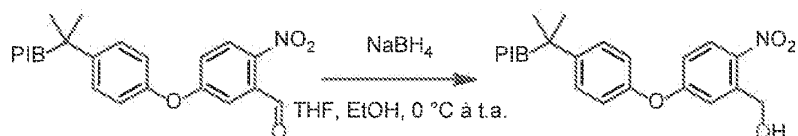
5 [Chem 14]



A une solution du dérivé PIB-phénol (1 équivalent) dans le toluène/DMF (1/1) (0,1 M), sous agitation et à température ambiante, ont été ajoutés le 5-fluoro-2-nitrobenzaldéhyde (3 équivalents) puis, le carbonate de potassium (3 équivalents). Le milieu réactionnel a été chauffé à 80 °C pendant 48 h puis refroidi à température ambiante. Le milieu réactionnel a été extrait trois fois au cyclohexane et lavé avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire à l'aryle-
 10 éther correspondant.

Exemple 7 :

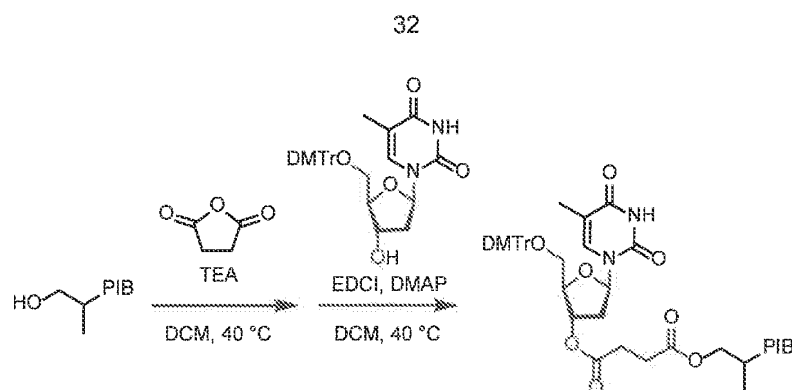
[Chem 15]



L'aldéhyde ancré (1 équivalent), a été dissout dans un mélange tétrahydrofurane/éthanol (1/1) (0,1 M) puis, refroidi à 0 °C pendant 5 minutes. Le borohydrure de sodium (3 équivalents) a été ajouté au milieu réactionnel (par petites portions) puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 30 minutes. Le milieu réactionnel
 20 a été concentré sous pression réduite puis, ont été successivement ajoutés au résidu une solution de soude 1N et du cyclohexane. La phase organique a ensuite été lavée à l'eau, à la saumure, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée sous pression réduite pour conduire à l'alcool benzylique correspondant.

30 Exemple 8 :

[Chem 16]



A une solution du dérivé PIB-alcool (1 équivalent) dans le dichlorométhane (0.1 M) sous agitation, sous atmosphère inerte et à température ambiante, ont été ajoutés l'anhydride succinique (1,1 équivalent) puis, la triéthylamine (1,2 équivalent). Le milieu réactionnel a

5 été chauffé à 40 °C pendant 18 h puis refroidi à température ambiante.

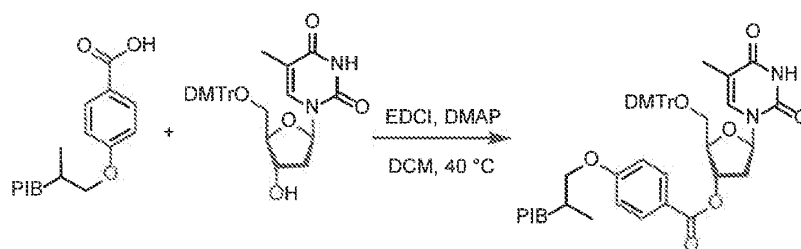
A ce stade, ont été successivement ajoutés au milieu réactionnel : la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)thymidine (1,1 équivalent), l'éthyl-(*N,N*-diméthylamino)-propylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) (1,1 équivalent) et la 4-(*N,N*-diméthylamino)-pyridine (DMAP) (0,5

10 équivalent) ; ensuite le milieu réactionnel a été chauffé à 40 °C pendant 18 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire à la thymidine ancrée correspondante.

15

Exemple 9 :

[Chem 17]



20

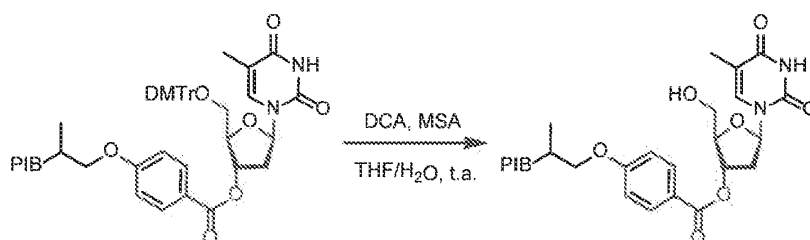
A une solution du dérivé PIB-acide carboxylique (1 équivalent) dans le dichlorométhane sous agitation, sous atmosphère inerte et à température ambiante, ont été ajoutés la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)thymidine (1,1 équivalent), l'éthyl-(*N,N*-diméthylamino)-propylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) (1,1 équivalent) et la 4-(*N,N*-diméthylamino)-pyridine

(DMAP) (0,5 équivalent) puis le milieu réactionnel a été chauffé à 40 °C pendant 18 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite et le résidu est purifié par filtration sur silice, si nécessaire, pour conduire

5 à la thymidine ancrée correspondante.

Exemple 10 :

[Chem 18]



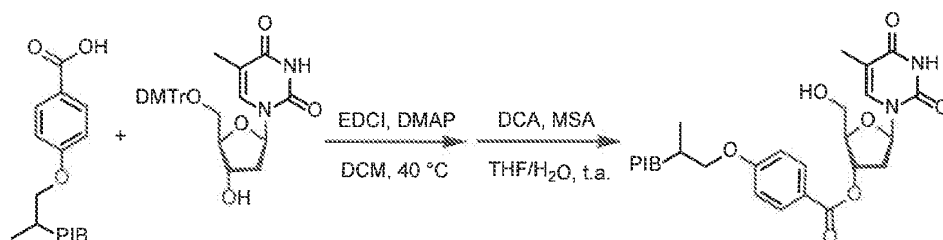
10 A une solution du dérivé de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)thymidine ancrée (1 équivalent) dans une mélange THF/H₂O (0,1 M), à température ambiante, ont été additionnés l'acide mercaptosuccinique (5 équivalents) puis de l'acide dichloroacétique (5% V) puis le milieu réactionnel a été agité pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur

15 sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé déprotégée de la thymidine ancrée correspondante.

Exemple 11 :

[Chem 19]

20



A une solution du dérivé PIB-acide carboxylique (1 équivalent) dans le dichlorométhane (0.1 M) sous agitation sous atmosphère inerte et à température ambiante, ont été ajoutés la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)thymidine (1,1 équivalent), l'éthyl-(*N,N*-diméthylamino)-propylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) (1,1 équivalent) et la 4-(*N,N*- diméthylamino)-

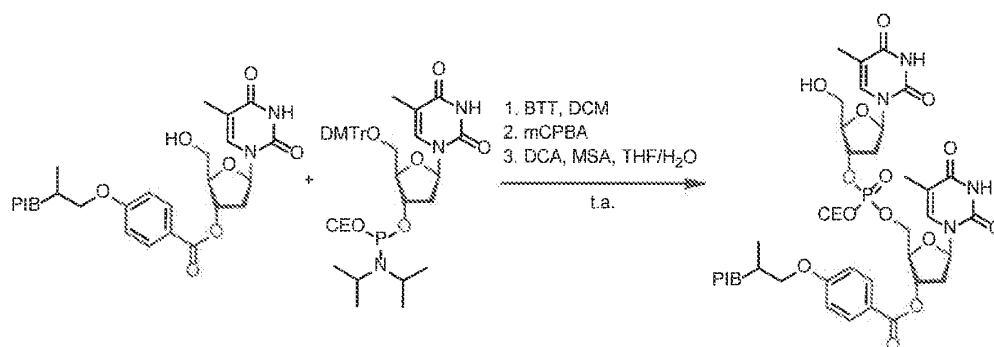
25

pyridine (DMAP) (0,5 équivalent). Ensuite le milieu réactionnel a été chauffé à 45 °C pendant 18 h puis évaporé.

Le résidu a été solubilisé dans un mélange THF/H₂O (9/1) (0.1 M), à température ambiante, puis ont été successivement additionnés l'acide mercaptosuccinique (5 équivalents), l'acide dichloroacétique (5% V) puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), une solution saturée de bicarbonate de sodium, de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé déprotégé de la thymidine ancrée correspondante.

Exemple 12 :

[Chem 20]



15

Le dérivé déprotégé de la thymidine ancrée (1 équivalent) et de la DMT-dT phosphoramidite (2 équivalents) ont été co-évaporé 3 fois au toluène anhydre puis séché sous vide. Au résidu sous atmosphère inerte ont été additionnés le dichlorométhane (0.1 M) puis une solution de benzylthio-1*H*-tetrazole (BTT) (4,5 équivalents) dans l'acétonitrile (0.01 M) et le milieu réactionnel a été agité pendant 16 h à température ambiante. Le mCPBA (3 équivalents) a été ajouté au milieu réactionnel puis agité pendant 1 h puis évaporé.

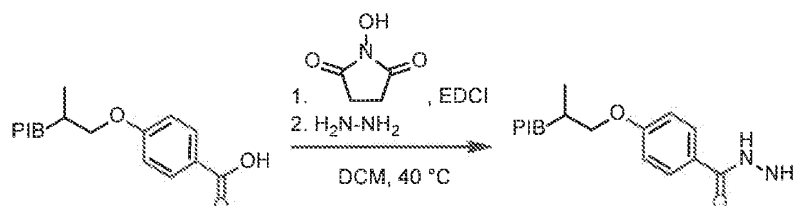
A ce stade, le résidu a été solubilisé dans un mélange THF/H₂O (9/1) (0.1 M), à température ambiante, puis ont été successivement additionnés l'acide mercaptosuccinique (5 équivalents), l'acide dichloroacétique (5% V) puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (10%), de la saumure, séché sur sulfate

25

de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé déprotégé dimère de la thymidine ancrée correspondante.

Exemple 13 :

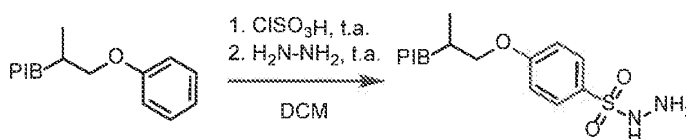
5 [Chem 21]



A une solution du dérivé PIB-acide benzoïque (1 équivalent) dans le dichlorométhane (0.1 M) sous agitation, sous atmosphère inerte et à température ambiante, ont été ajoutés le
 10 *N*-hydroxysuccinimide (1.1 équivalent), l'ethyl-(*N,N*-diméthylamino)-propylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) (1,1 équivalent) et la 4-(*N,N*- diméthylamino)-pyridine (DMAP) (0,1 équivalent) puis le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C pendant 30 min, puis refroidi à température ambiante. L'hydrate d'hydrazine est additionné au milieu réactionnel puis chauffé à 40 °C pendant 30 min. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au
 15 cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé PIB-acyl hydrazide correspondant.

Exemple 14:

20 [Chem 22]

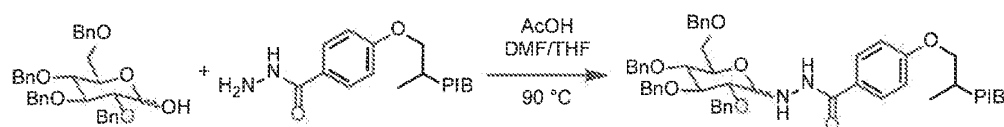


A une solution du dérivé PIB-aryle (1 équivalent) dans le dichlorométhane (0,1 M) sous agitation, sous atmosphère inerte et à température ambiante, a été ajouté goutte à goutte
 25 l'acide chlorosulfurique (1,1 équivalent), puis le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 30 min. L'hydrate d'hydrazine (3 équivalents) est additionné au milieu réactionnel puis agité pendant 30 min. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de

la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé PIB-sulfonyl hydrazide correspondant.

Exemple 15 :

5 [Chem 23]

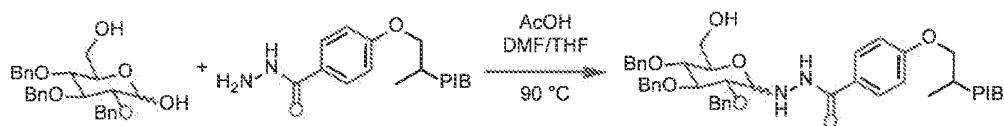


Au mélange PIB-acyl hydrazide (1 équivalent) et 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glucopyranose (1,5 équivalent) dans un mélange DMF/THF (9/1) (0,1 M) a été additionné de l'acide acétique (0,01 équivalent) puis le mélange réactionnel a été chauffé à 90 °C pendant 18 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé PIB-glycosylhydrazide correspondant.

15

Exemple 16:

[Chem 24]



20

Au mélange PIB-acyl hydrazide (1 équivalent) et 2,3,4-tri-O-benzyl-D-glucopyranose (1,5 équivalent) dans un mélange DMF/THF (9/1) (0,1 M) a été additionné de l'acide acétique (0,01 équivalent) puis le mélange réactionnel a été chauffé à 90 °C pendant 18 h. Le milieu réactionnel a été évaporé puis extrait au cyclohexane, lavé 3 fois avec un mélange éthanol/eau (90/10), de la saumure, séché sur sulfate de sodium, filtré, concentré sous pression réduite pour conduire au dérivé PIB-glycosylhydrazide correspondant.

25